Postverlagsort Berlin

ZEITSCHRIFT
FÜR
VERGLEICHENDE PHYSIOLOGIE

BEGRÜNDET VON

K. v. FRISCH UND A. KÜHN

HERAUSGEGEBEN VON

K. v. FRISCH
MÜNCHEN

E. v. HOLST
SEEWIESEN/OBB.

H. H. WEBER
HEIDELBERG

44. BAND, 3. HEFT

MIT 59 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 21. FEBRUAR 1961)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1961

Z. vergl. Physiol.

Preis DM 28.60

Zeitschrift für vergleichende Physiologie

Begründet 1924 von K. von Frisch und A. Kühn. Band 1—29 (1934) unter dem Titel: „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abt. C: Zeitschrift für vergleichende Physiologie. Berlin, Springer.

Die **„Zeitschrift für vergleichende Physiologie"** steht offen Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der allgemeinen Physiologie und speziellen Tierphysiologie, soweit die Ergebnisse als Bausteine zu einer vergleichenden Physiologie gewertet werden können.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung nach Maßgabe des eingehenden Materials zwanglos, in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Die Arbeiten können in deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßt sein.

Manuskripte nehmen entgegen:

Professor Dr. K. von Frisch, München 9, Über der Klause 10,

Professor Dr. E. von Holst, Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie, Seewiesen/Obb. über Starnberg,

Professor Dr. H. H. Weber, Institut für Physiologie im Max-Planck-Institut für Med. Forschung, Heidelberg, Jahnstraße 29.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 60.— für eine Arbeit.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0,30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 40 Sonderdrucke unentgeltlich.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Im Interesse der unbedingt gebotenen Sparsamkeit wollen die Herren Verfasser auf knappste Fassung ihrer Arbeiten und Beschränkung des Abbildungsmaterials auf das unbedingt erforderliche Maß bedacht sein.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Springer-Verlag

Heidelberg
Neuenheimer Landstraße 28—30
Fernsprecher 27901 · Fernschreiber 04-61723

Berlin-Wilmersdorf
Heidelberger Platz 3
Fernsprecher 830301 · Fernschreiber 01-83319

44. Band — Inhaltsverzeichnis — 3. Heft

Seite

SCHLABRITZKY, E., Die Beeinflussung der embryonalen Dorsal-Kontraktionen durch Nervenextrakte und Acetylcholin bei der Wanderheuschrecke (Locusta migratoria migratorioides R. et F.). Mit 2 Textabbildungen 237

FERRERI, E., La fosfomonoesterasi alcalina e la D-L-alanil-glicina dipeptidasi nell'intestino di *Murex trunculus* L. Ricerche biochimiche ed istochimiche Con 12 Figure nel testo 242

VOGEL, G., R. MADUS und H.-D. LEHMANN, Einige Daten zum Blutbild des Rothirsches *(Cervus elaphus* L.). Mit 1 Textabbildung 258

BORNSCHEIN, H., Zur Netzhautfunktion des Alpenmurmeltiers *Marmota marmota* (L.). Mit 4 Textabbildungen 262

MOODY, M. F., and J. R. PARRISS, The discrimination of polarized light by *Octopus:* A behavioural and morphological study. With 14 Figures in the Text 268

RENSING, L., Aktivitätsperiodik des Wasserläufers *Velia currens* F. Mit 23 Textabbildungen 292

VEERDONK, F. C. G. VAN DE, J. W. HUISMANS and A. D. F. ADDINK, A melanocyte-stimulating substance in the skin secretion of *Xenopus laevis.* With 3 Figures in the Text 323

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Zeitschrift für vergleichende Physiologie 44, 237—241 (1961)

Zoologisches Institut der Universität des Saarlandes

DIE BEEINFLUSSUNG DER EMBRYONALEN DORSALKONTRAKTIONEN DURCH NERVENEXTRAKTE UND ACETYLCHOLIN BEI DER WANDERHEUSCHRECKE (LOCUSTA MIGRATORIA MIGRATORIOIDES R. ET F.)

Von

E. Schlabritzky

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. Oktober 1960)

Die Herztätigkeit der Insekten ist in den letzten Jahren häufig Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen. Durch Zugabe von Nervenextrakten (M. L. Cameron 1953, P. B. Wigglesworth 1954, H. Unger 1957, M. Gersch 1958) oder anderer Stoffe wie Acetylcholin, Adrenalin, Coffein u. a. m. (H. L. Hamilton 1939, D. Davenport 1949, B. J. Krijgsman und N. E. Krijgsman 1950, E. Florey 1952, C. C. Davis 1956, H. Unger 1957, M. Gersch 1958) sollte geklärt werden, ob eine hormonale, myogene oder nervöse Regulation vorliegt. Die meisten Autoren experimentierten am Herzen adulter Insekten; Florey und Gersch wählten Larven von Corethra zum Versuchsobjekt.

In der vorliegenden Arbeit werden Embryonen der Wanderheuschrecke untersucht. Es wird die Frage aufgeworfen, ob auch schon die Steuerung embryonaler Dorsalkontraktionen durch Nervenextrakte oder Azetylcholin zu beeinflussen ist.

Material und Methode

Alle Versuche wurden an Embryonen der Wanderheuschrecke Locusta migratoria migratorioides R. et F. durchgeführt. Die Zucht der Imagines (gregaria-Phase) erfolgte nach den Anweisungen von P. Hunter-Jones (1956). Zur genauen Altersbestimmung der Embryonen diente die Ausbrütung der Eigelege in einem Thermostaten bei 32° C. Die einzelnen Abschnitte der Embryonalentwicklung stimmen mit den Angaben von M. Roonwal (1937) überein, die Gesamtentwicklungszeit betrug jedoch nur 12 Tage.

Zu Beginn der Versuche wurde das Chorion der Eier nach den Angaben von E. Slifer (1932) mit Natriumhypophosphat-Lösung entfernt. Hierauf folgte mehrmaliges Waschen mit Aqua dest. und Überführung der Eier in Hohlglasblöcke mit abgewandelter Ringerlösung nach K. Bělař (1929) (0,9% NaCl; 0,02% KCl; 0,02% $CaCl_2$; gepuffert auf p_H 6,6 mit 5 ml isotonischem Natriumphosphat-Puffer je 100 ml Ringerlösung). Die Eier wurden an dem Ende, wo sich der Dotter befand, angestochen und die Spitze abgeschnitten; danach ließ sich der Embryo mit einem gebogenen Platindraht leicht herausdrücken. Die den Dotter umgebende Serosa wurde zwar verletzt, zog sich jedoch nach wenigen Minuten wieder zusammen. Die gleiche Methode verwandte D. H. Bucklin (1959) bei Versuchen mit Melanoplus differentialis.

Zeitschrift für vergleichende Physiologie

Begründet 1924 von K. von Frisch und A. Kühn. Band 1—29 (1934) unter dem Titel: „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abt. C: Zeitschrift für vergleichende Physiologie. Berlin, Springer.

Die **„Zeitschrift für vergleichende Physiologie"** steht offen Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der allgemeinen Physiologie und speziellen Tierphysiologie, soweit die Ergebnisse als Bausteine zu einer vergleichenden Physiologie gewertet werden können.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung nach Maßgabe des eingehenden Materials zwanglos, in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Die Arbeiten können in deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßt sein.

Manuskripte nehmen entgegen:

Professor Dr. K. von Frisch, München 9, Über der Klause 10,

Professor Dr. E. von Holst, Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie, Seewiesen/Obb. über Starnberg,

Professor Dr. H. H. Weber, Institut für Physiologie im Max-Planck-Institut für Med. Forschung, Heidelberg, Jahnstraße 29.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 60.— für eine Arbeit.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 40 Sonderdrucke unentgeltlich.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Im Interesse der unbedingt gebotenen Sparsamkeit wollen die Herren Verfasser auf knappste Fassung ihrer Arbeiten und Beschränkung des Abbildungsmaterials auf das unbedingt erforderliche Maß bedacht sein.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Springer-Verlag

Heidelberg
Neuenheimer Landstraße 28—30
Fernsprecher 27901 · Fernschreiber 04-61723

Berlin-Wilmersdorf
Heidelberger Platz 3
Fernsprecher 830301 · Fernschreiber 01-83319

---

44. Band — **Inhaltsverzeichnis** — 3. Heft

Seite

SCHLABRITZKY, E., Die Beeinflussung der embryonalen Dorsal-Kontraktionen durch Nervenextrakte und Acetylcholin bei der Wanderheuschrecke (Locusta migratoria migratorioides R. et F.). Mit 2 Textabbildungen 237

FERRERI, E., La fosfomonoesterasi alcalina e la D-L-alanil-glicina dipeptidasi nell'intestino di *Murex trunculus* L. Ricerche biochimiche ed istochimiche Con 12 Figure nel testo 242

VOGEL, G., R. MADUS und H.-D. LEHMANN, Einige Daten zum Blutbild des Rothirsches *(Cervus elaphus* L.). Mit 1 Textabbildung 258

BORNSCHEIN, H., Zur Netzhautfunktion des Alpenmurmeltiers *Marmota marmota* (L.). Mit 4 Textabbildungen 262

MOODY, M. F., and J. R. PARRISS, The discrimination of polarized light by *Octopus:* A behavioural and morphological study. With 14 Figures in the Text 268

RENSING, L., Aktivitätsperiodik des Wasserläufers *Velia currens* F. Mit 23 Textabbildungen 292

VEERDONK, F. C. G. VAN DE, J. W. HUISMANS and A. D. F. ADDINK, A melanocyte-stimulating substance in the skin secretion of *Xenopus laevis*. With 3 Figures in the Text 323

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Zeitschrift für vergleichende Physiologie 44, 237—241 (1961)

Zoologisches Institut der Universität des Saarlandes

DIE BEEINFLUSSUNG DER EMBRYONALEN DORSALKONTRAKTIONEN DURCH NERVENEXTRAKTE UND ACETYLCHOLIN BEI DER WANDERHEUSCHRECKE (LOCUSTA MIGRATORIA MIGRATORIOIDES R. ET F.)

Von

E. Schlabritzky

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. Oktober 1960)

Die Herztätigkeit der Insekten ist in den letzten Jahren häufig Gegenstand eingehender Untersuchungen gewesen. Durch Zugabe von Nervenextrakten (M. L. Cameron 1953, P. B. Wigglesworth 1954, H. Unger 1957, M. Gersch 1958) oder anderer Stoffe wie Acetylcholin, Adrenalin, Coffein u. a. m. (H. L. Hamilton 1939, D. Davenport 1949, B. J. Kriijgsman und N. E. Kriijgsman 1950, E. Florey 1952, C. C. Davis 1956, H. Unger 1957, M. Gersch 1958) sollte geklärt werden, ob eine hormonale, myogene oder nervöse Regulation vorliegt. Die meisten Autoren experimentierten am Herzen adulter Insekten; Florey und Gersch wählten Larven von Corethra zum Versuchsobjekt.

In der vorliegenden Arbeit werden Embryonen der Wanderheuschrecke untersucht. Es wird die Frage aufgeworfen, ob auch schon die Steuerung embryonaler Dorsalkontraktionen durch Nervenextrakte oder Azetylcholin zu beeinflussen ist.

Material und Methode

Alle Versuche wurden an Embryonen der Wanderheuschrecke Locusta migratoria migratorioides R. et F. durchgeführt. Die Zucht der Imagines (gregaria-Phase) erfolgte nach den Anweisungen von P. Hunter-Jones (1956). Zur genauen Altersbestimmung der Embryonen diente die Ausbrütung der Eigelege in einem Thermostaten bei 32° C. Die einzelnen Abschnitte der Embryonalentwicklung stimmen mit den Angaben von M. Roonwal (1937) überein, die Gesamtentwicklungszeit betrug jedoch nur 12 Tage.

Zu Beginn der Versuche wurde das Chorion der Eier nach den Angaben von E. Slifer (1932) mit Natriumhypophosphat-Lösung entfernt. Hierauf folgte mehrmaliges Waschen mit Aqua dest. und Überführung der Eier in Hohlglasblöcke mit abgewandelter Ringerlösung nach K. Bělař (1929) (0,9% NaCl; 0,02% KCl; 0,02% $CaCl_2$; gepuffert auf p_H 6,6 mit 5 ml isotonischem Natriumphosphat-Puffer je 100 ml Ringerlösung). Die Eier wurden an dem Ende, wo sich der Dotter befand, angestochen und die Spitze abgeschnitten; danach ließ sich der Embryo mit einem gebogenen Platindraht leicht herausdrücken. Die den Dotter umgebende Serosa wurde zwar verletzt, zog sich jedoch nach wenigen Minuten wieder zusammen. Die gleiche Methode verwandte D. H. Bucklin (1959) bei Versuchen mit Melanoplus differentialis.

Anschließend wurden die Embryonen mit einer Haarschlinge zwischen Kopf und Thorax abgebunden und unmittelbar vor der Ligatur dekapitiert. Um die hierdurch ausgelöste Beschleunigung der dorsalen Kontraktionen abklingen zu lassen, begann die Injektion jeweils erst 2 Std später.

Es wurden für jeden Versuch neue Mikropipetten von etwa 50 μ Durchmesser hergestellt und an einem Mikromanipulator befestigt. Durch einen Schlauch standen sie mit einer fest auf den Tisch montierten Rekordspritze in Verbindung, deren Metallstempel durch Zahnradtrieb abgestufte Injektionen kleinster Mengen ermöglichte. Die Mikropipetten wurden durch die Haarschlinge in den Embryo eingeführt, eine Technik, die auch M. Gersch (1958) bei seinen Hormonversuchen an der Larve von Corethra angewandt hat.

Das Einströmen der Flüssigkeit konnte durch das Binokular im Durchlicht gut beobachtet werden. Bei einem leichten Anschwellen des Embryos wurde die Injektion beendet.

Da die in einer anderen Arbeit beschriebene Registriereinrichtung (E. Schlabritzky, im Druck) nicht mehr zur Verfügung stand, mußten die Dorsalkontraktionen je Minute in den auf der Abszisse von Abb. 1 angegebenen Zeitabständen nach der Injektion unter dem Binokular gezählt werden. Für eine ungestörte Beobachtung erwies sich die Zeitansage durch ein Tonbandgerät als zweckmäßig.

Alle Lösungen wurden stets frisch angesetzt und mit einem Jenaer Ganzglas-Bakterienfilter sterilisiert. Die Behandlung der Glassachen und Instrumente erfolgte nach den in der Gewebezucht üblichen Methoden. Auf diese Weise war es möglich, die Embryonen auch über die genannten Zeiten hinaus bis zu 3 Tagen in dekapitiertem Zustand bei 27° C am Leben zu erhalten und dadurch den normalen Ablauf der Versuche zu kontrollieren.

Ergebnisse der Versuche

Parallel zu jeder der im folgenden beschriebenen Versuchsreihen wurde die Wirkung der *Ringerlösung* ohne Zusätze geprüft. Es zeigte sich hierbei niemals eine Frequenzänderung der Dorsalkontraktionen. Lediglich kurz nach Versuchsbeginn ließ sich stets eine höchstens 3 min andauernde geringe Beschleunigung der Pulsationen erkennen. Sie ist wahrscheinlich auf die mechanische Reizung durch den Injektionsvorgang zurückzuführen. Versuchsweise wurde einigen Embryonen eine mehrfache Menge Ringerlösung injiziert, doch blieb die daraufhin aufgetretene starke Dehnung ohne Wirkung auf die Anzahl der Dorsalkontraktionen pro Minute.

Für die Gewinnung der *Nervenextrakte* wurden von jeweils zwei 11 Tage alten Embryonen (Gesamtentwicklungsdauer im Ei 12 Tage) die Unterschlund-, Thorakal- oder Abdominalganglien herauspräpariert und in einem Mikromörser in 2 ml Wasser zerrieben. Es folgte Eindampfen im Wasserbad und Aufnehmen mit 10 ml Ringerlösung. Diese Extrakte wurden den dekapitierten Embryonen injiziert. Bei jeweils 10 aufeinanderfolgenden Einzelversuchen mit dem gleichen Resultat wurde das Ergebnis als gesichert angesehen.

Bei allen Nervenextrakt-Injektionen zeigte sich zuerst, wie bei den Kontrollen mit Ringerlösung, eine Beschleunigung der Pulsation. Sie ist wahrscheinlich auch hier auf die mechanische Reizung durch die

Einführung der Mikropipette zurückzuführen. Es fällt allerdings auf, daß der Frequenzanstieg nach Zugabe von Thorakalganglien-Extrakt wesentlich höher ist als bei den Versuchen mit Ringerlösung.

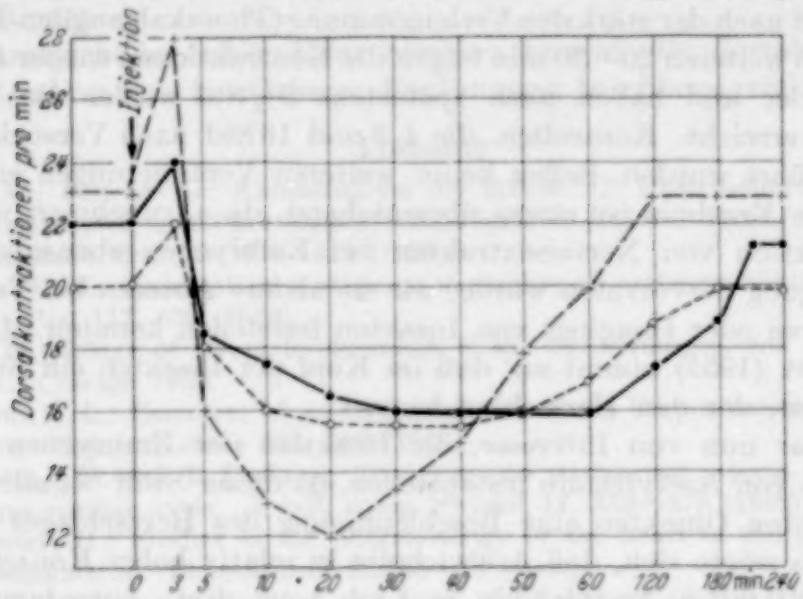

Abb. 1. Beeinflussung der embryonalen Dorsalkontraktionen durch Injektion von Extrakten aus Unterschlundganglien ○---○, Thorakalganglien + — — + und Abdominalganglien ●——●. (Zusammenfassung aller Einzelversuche)

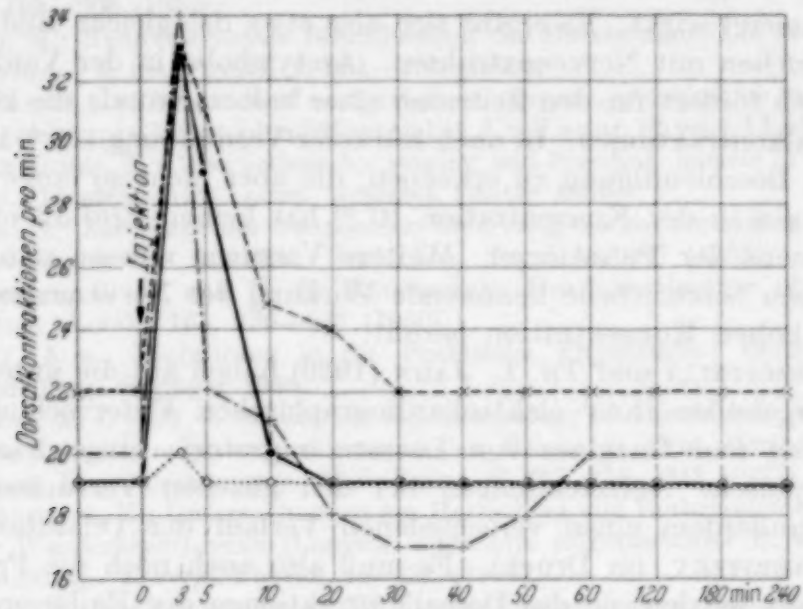

Abb. 2. Beeinflussung der embryonalen Dorsalkontraktionen durch Injektion von Azetylcholin der Verdünnungsstufen 10^{-6} + – · – +, 10^{-7} × – – – – – ×, 10^{-8} ●——● und 10^{-10} ○·····○. (Zusammenfassung aller Einzelversuche)

Bereits nach 5 min läßt sich jedoch eine deutliche Verlangsamung der Dorsalkontraktionen erkennen. Ihre Frequenz sinkt unter die Werte zu Beginn der Versuche und hat nach 20—30 min ein Minimum erreicht.

Im Gegensatz zu Embryonen, die durch eine mißglückte Präparation schwer geschädigt wurden, sind die Pulsationen noch durchaus energisch und regelmäßig, lediglich ihr zeitlicher Abstand hat sich geändert.

Sofort nach der stärksten Verlangsamung (Thorakalganglien-Extrakt) oder nach weiteren 20—30 min folgen die Kontraktionen wieder schneller aufeinander und haben nach spätestens $3^1/_2$ Std wieder die Anfangsfrequenz erreicht. Kontrollen, die 4, 8 und 16 Std nach Versuchsbeginn durchgeführt wurden, ließen keine weiteren Veränderungen erkennen.

Dieses Ergebnis ist etwas überraschend, da anzunehmen war, daß die Injektion von Nervenextrakten bei Embryonen ebenso eine Beschleunigung hervorrufen würde, wie sie andere Autoren bei Versuchen mit Larven oder Imagines von Insekten feststellen konnten. Lediglich E. Florey (1952) nimmt an, daß im Kopf der Insekten ein Stoff vorhanden ist, der den Herzschlag hemmt.

Es war nun von Interesse, die Reaktion der Embryonen auf die Injektion von Azetylcholin festzustellen, da dieser Stoff bei allen bisher untersuchten Objekten eine Beschleunigung des Herzschlages bewirkt hatte. Es zeigte sich, daß Azetylcholin in relativ hoher Konzentration (1:1000 = 0,001 g Azetylcholin je 1 ml Aqua dest., eingedampft und mit 1 ml Ringerlösung aufgenommen) in den ersten 10 min zwar eine schnellere Folge der Dorsalkontraktionen bewirkt, dann aber 50 min lang hemmend wirkt. Es ergibt sich also etwa das gleiche Bild wie bei den Versuchen mit Nervenextrakten. Azetylcholin in der Verdünnung 10^{-7} jedoch fördert für den Zeitraum einer halben Stunde die Frequenz der Dorsalkontraktionen. In noch stärkerer Verdünnung (10^{-8}) ist ebenfalls eine Beschleunigung zu erkennen, die aber nicht so lange anhält; Azetylcholin in der Konzentration 10^{-10} hat keinen Einfluß mehr auf die Frequenz der Pulsationen. Weitere Versuche müssen nun zeigen, ob die oben beschriebene hemmende Wirkung der Nervenextrakte auf einer zu hohen Konzentration beruht.

F. Crescitelli und Th. L. Jahn (1939) haben auf die unterschiedlichen Ergebnisse ihrer elektrokardiographischen Untersuchungen an Embryonen und Imagines von Locusta migratoria hingewiesen. Mechanographische Aufzeichnungen bei den gleichen Versuchsobjekten ergaben außerdem einen verschiedenen Verlauf der Dilatationsphase (E. Schlabritzky, im Druck). Es muß also auch noch die Frage berücksichtigt werden, ob die Dorsalkontraktionen der Embryonen dem Herzschlag adulter Insekten gleichzusetzen sind.

Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Es wurde die Wirkung von injizierten Nervenextrakten und Azetylcholin auf die Dorsalkontraktionen dekapitierter Embryonen von Locusta migratoria geprüft.

2. Extrakte embryonaler Unterschlund-, Thorakal- und Abdominalganglien wirken über einen längeren Zeitraum hemmend.

3. Die Injektion von Ringerlösung hat keinen Einfluß auf die Dorsalkontraktionen.

4. Azetylcholin hoher Konzentration hemmt die dorsalen Pulsationen, während es in stärkerer Verdünnung beschleunigend wirkt.

Literatur

Bělař, K.: Beiträge zur Kausalanalyse der Mitose. II. Untersuchungen an den Spermatocyten von Chorthippus (Stenobothrus) lineatus Panz. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **118**, 359—484 (1929).

Bucklin, D. H.: Termination of diapause in grashopper embryos cultured in vitro. Anat. Rec. **117**, 539 (1953).

— In: Physiology of insect development, S. 35—38, herausgeg. von F. L. Campbell. Chicago 1959.

Cameron, M. L.: Secretion of an Orthodiphenol in the Corpus cardiacum of the insect. Nature (Lond.) **172**, 349 (1953).

Crescitelli, F., and T. L. Jahn: Electrical and mechanical aspects of the grashopper cardiac cycle. J. cell. comp. Physiol. **11**, 359—376 (1938).

Davenport, D.: Studies in the pharmacology of the heart of the orthopteran, Stenopelmatus. Physiol. Zool. **22**, 35—44 (1949).

Davis, C. C.: Experiments upon the heart of Chaoborus albipes (Diptera, Culicidae). J. cell. comp. Physiol. **47**, 449—468 (1956).

Florey, E.: Neurohormone und ihre Funktion bei Arthropoden. Zool. Anz. Suppl. **16**, 199—206 (1952).

Gersch, M.: Neurohormonale Beeinflussung der Herztätigkeit bei der Larve von Corethra. J. ins. Physiol. **2**, 281—297 (1958).

Hamilton, H. L.: The action of acetylcholine, atropine, and nicotine on the heart of the grashopper (Melanoplus differentialis). J. cell. comp. Physiol. **13**, 91—104 (1939).

Hunter-Jones, P.: Instructions for rearing and breeding locusts in the laboratory. London: Anti-Locust Research Centre 1956.

Koller, G.: Zur Frage der hormonalen Steuerung bei rhythmischen Eingeweidebewegungen von Insekten. Zool. Anz. Suppl. **18**, 417 (1955).

Kreijgsman, B. J., and N. E. Kreijgsman: Heart mechanism of arthropods. Nature (Lond.) **165**, 936—937 (1950).

Muralt, A. v.: Einführung in die Praktische Physiologie. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1948.

Roonwal, M. L.: III — Studies on the embryology of the African migratory locust, Locusta migratoria migratorioides Reiche et Frm. (Orthoptera, Acrididae). II — Organogeny. Phil. Trans. B **227**, 176—243 (1937).

Schlabritzky, E.: Untersuchungen am Herzschlag von Embryonen und Imagines der Wanderheuschrecke (Locusta migratoria migratorioides R. et F., Orthopteroidea). Z. vergl. Physiol. **44**, 232 (1961).

Slifer, E. H.: Insect development. IV. External morphology of grashopper embryos of known age and with a known temperature history. J. Morph. **53**, 1—21 (1932).

Unger, H.: Untersuchungen zur neurohormonalen Steuerung der Herztätigkeit bei Schaben. Biol. Zbl. **76**, 204—225 (1957).

Wigglesworth, V. B.: Neurosecretion and the corpus cardiacum on insects. Pubbl. Staz. zool. Napoli **24**, Suppl. 41 (1954).

Dr. E. Schlabritzky,

Zoologisches Institut der Universität des Saarlandes, Saarbrücken

Zeitschrift für vergleichende Physiologie 44, 242—257 (1961)

Istituto di Anatomia comparata ed Istologia dell'Università di Torino
(Direttore: Prof. V. Mazzi)

LA FOSFOMONOESTERASI ALCALINA E LA D-L-ALANIL-GLICINA DIPEPTIDASI NELL'INTESTINO DI *MUREX TRUNCULUS* L. RICERCHE BIOCHIMICHE ED ISTOCHIMICHE* **

Di

E. Ferreri

Con 12 Figure nel testo

(In redazione il 4. Novembre 1960)

Introduzione

Le ricerche enzimologiche condotte in passato sull'apparato digerente dei Molluschi in generale e dei Gasteropodi in particolare sono abbastanza numerose. Però, in base all'opinione corrente che l'epitelio intestinale non partecipasse alla produzione di fermenti digestivi, la maggior parte di tali ricerche fu consacrata allo studio di alcuni enzimi secreti dalle ghiandole annesse al tubo digerente.

Fra gli AA. che si occuparono di tale argomento, mi limito a citare soltanto quelli che, con metodi biochimici ed istochimici, studiarono prevalentemente gli enzimi proteolitici e la fosfomonoesterasi alcalina del tubo digerente e delle ghiandole annesse nei Gasteropodi Polmonati e Prosobranchi.

Hirsch (1915) esaminò biochimicamente l'attività di alcuni enzimi (proteasi, amilasi, lipasi) presenti nelle ghiandole dell'apparato digerente di Molluschi Gasteropodi carnivori.

Brock (1933) analizzò in *Buccinum* (Prosobranchi) l'azione degli estratti delle ghiandole salivari, della ghiandola di Leiblein e della ghiandola dell'intestino medio su diverse sostanze (proteine, idrati di carbonio, dipeptidi, olio di oliva ecc.); inoltre ricercò l'attività enzimatica del succo digestivo, reperibile nel lume intestinale e formato, secondo l'A., dalla secrezione delle predette ghiandole; infine, egli riportò i valori del pH ottimale in corrispondenza del quale agiscono i vari enzimi studiati. Questi ultimi dati sono reperibili anche in Krüger (1933), sia per *Patella* che per *Buccinum*.

Mansour-Bek (1934) esaminò biochimicamente le caratteristiche degli enzimi parziali della proteolisi nelle varie ghiandole dell'apparato digerente di *Murex anguliferus*.

Rosén (1935, 1936) condusse ampie ricerche biochimiche sugli enzimi proteolitici presenti nelle ghiandole annesse all'intestino medio di *Helix*, *Patella* e *Buccinum*.

* Al Prof. A. Corti in occasione del Suo 80° compleanno.

** Queste ricerche furono eseguite e pubblicate con un contributo del C.N.R.

Dessaux (1948) studiò con metodo biochimico le fosfatasi dell'epatopancreas di *Helix pomatia*, la cui presenza era già stata segnalata da Manigault (1939); l'A. individuò tre fosfomonoesterasi (tipo I, II, III), diverse tra loro per il pH ottimale di attività e per il comportamento di fronte ad attivatori ed inibitori.

Hébert (1950) dimostrò istochimicamente la presenza di fosfomonoesterasi alcalina nell'epitelio della regione media dell'intestino di *Helix aspersa*. Lo stesso reperto è stato ottenuto nel nostro Istituto (Guardabassi e Ferreri, 1951a; 1953b) su *Helix pomatia*; in questa specie, però, abbiamo potuto dimostrare per via istochimica una distribuzione dell'enzima più estesa di quella osservata da Hébert in *Helix aspersa*.

Morton (1951), in un lavoro sull'apparato digerente degli Struthiolaridae (Gasteropodi), sulla scia dell'opinione degli AA. precedenti, conferma la presenza di enzimi intracellulari nella ghiandola dell'intestino medio e nega l'esistenza di fermenti nel succo digestivo, fatta eccezione per quelli dello stilo cristallino.

Genesi (1955) osservò la positività della reazione di Gomori per la fosfatasi alcalina nella porzione distale delle cellule dell'epitelio intestinale di *Patella* e *Fissurella*.

Infine, Buddenbrock (1956), riportando molti dei dati che ho ricordato ed anche alcuni di altri AA., ribadisce il vecchio concetto, secondo il quale nell'epitelio del tubo digerente dei Molluschi Gasteropodi sarebbe assente qualunque attività enzimatica.

Negli anni 1957—'59 (Ferreri, 1957, 1958a, b; Ferreri e Ducato, 1959a, b), ho dimostrato biochimicamente ed istochimicamente la presenza di un enzima ad attività lipolitica nell'epitelio del tubo digerente di tre specie di Molluschi Gasteropodi (*Helix pomatia*, *Murex trunculus* e *Planorbis corneus*).

Tenendo conto dei dati prevalentemente negativi che ho riportato e sopratutto dei miei reperti positivi sulla presenza di un enzima lipolitico nell'epitelio del tubo digerente di alcune specie di Gasteropodi, ho ritenuto interessante riprendere in esame una parte del vasto problema dell'enzimologia dell'apparato digerente dei Molluschi.

Pertanto mi sono proposta di ricercare biochimicamente ed istochimicamente se nel tubo digerente di un Mollusco Gasteropode (*Murex trunculus* L.) fossero presenti, oltre la lipasi, anche altri enzimi, legati in qualche modo ai processi digestivi e di assorbimento. Ho studiato, per via biochimica ed istochimica, la fosfomonoesterasi alcalina; e, per via esclusivamente biochimica, una dipeptidasi. La scelta di questo ultimo enzima è stata fatta tenendo conto del regime alimentare della specie da me esaminata: infatti, *Murex trunculus* è un Gasteropode carnivoro.

Queste ricerche mi hanno permesso di dimostrare che ambedue gli enzimi sono presenti nel canale intestinale di *Murex trunculus*.

Materiale e metodi

1. Per la ricerca biochimica della fosfomonoesterasi alcalina ho applicato il metodo di Bodansky, con alcune varianti, imposte da esigenze di ricerca. Gli ortofosfati sono stati determinati secondo il metodo di Youngbourg e Youngbourg.

2. Per la determinazione biochimica della D-L-alanil-glicina dipeptidasi ho applicato il metodo di Linderstrøm-Lang e Holter, secondo De Cesaris Coromaldi e Urbani Mistruzzi (1959).

Per ogni prova si usavano 2—5 esemplari di *Murex trunculus*[1]. Il materiale in esame veniva preparato, per entrambi i metodi, nel modo seguente: si prelevava tutto il tubo digerente, dall'organo piriforme (escluso) all'intestino terminale; si apriva longitudinalmente, si lavava accuratamente con soluzione fisiologica (Gautrelet, 1932) per allontanare il succo digerente, si asciugava su carta bibula; si pesava, si omogeneizzava con l'apparecchio di Potter-Elvehjem per 2 min; infine si otteneva l'estratto acquoso del materiale centrifugando l'omogeneato per 5 min a 3500 g.m.

3. Per la ricerca istochimica della fosfomonoesterasi alcalina è stato applicato il metodo Gomori (fissazione formolo-calcio a $+4°$ C).

Ricerche personali

Ricerche biochimiche sulla fosfomonoesterasi alcalina

1. Curva di attività in funzione del tempo di incubazione. Per tutti gli esperimenti la composizione delle prove era la seguente: 0,450 ml[2] di soluzione regolatrice della reazione (tampone glicina-soda secondo Sörenson-Walbum); 0,050 ml di substrato (β-glicerofosfato di sodio 0,016 M); 0,050 ml di estratto enzimatico preparato con le modalità predette. Prima dell'addizione dell'estratto enzimatico, le prove venivano portate all'equilibrio termico mantenendole per 10 min alla temperatura richiesta dall'esperienza.

I tubi da centrifuga erano, quindi, tenuti a bagno maria per il tempo voluto e alla temperatura richiesta dalla prova; l'attività enzimatica si bloccava con acido tricoloroacetico 10% (0,450 ml) e, dopo soggiorno dei tubi in ghiaccio per circa 20 min, si centrifugava. La lettura degli ortofosfati si eseguiva secondo il metodo di Youngbourg e Youngbourg su 0,2 ml di liquido limpido, usando lo spettrofotometro Unicam SP. 600, alla lunghezza d'onda di 720 mμ (vaschette con cammino ottico di mm. 10).

Tutte le prove erano condotte in doppio. I valori riportati nelle curve rappresentano la media aritmetica delle due determinazioni. L'attività enzimatica era espressa in γ di fosforo liberati dal substrato per azione dell'enzima. I valori dei γ si leggevano in base ad una curva di taratura (Fig. 1), allestita secondo le modalità riportate da Bargoni (1954).

[1] Ringrazio vivamente il Prof. Aldo Garlanda, Veterinario provinciale di La Spezia, che mi ha fornito gli animali, sia per questa ricerca, sia per le mie precedenti indagini su *Murex* (Ferreri e Ducato, 1959a, b).

[2] Le quantità introdotte nei tubi erano misurate con micropipette a costrizione della ditta Pedersen di Copenhagen.

Dopo aver sperimentato varie diluizioni dell'estratto enzimatico, con la concentrazione di 1 mg di organo omogeneizzato in 5 μl di acqua distillata ho ottenuto la curva della Fig. 2, che rappresenta l'andamento dell'idrolisi del substrato in funzione del tempo di incubazione, con tampone glicina-soda secondo Sörenson-Walbum, a pH 9,6 e a 39° di temperatura del bagno di incubazione. Nella Fig. 2 la reazione decorre perfettamente lineare fino a 40 min, corrispondenti al 75,2% di idrolisi del substrato; indi ha inizio la flessione della curva. Pertanto l'idrolisi segue la cinetica di una reazione di ordine 0. In base alla curva della Fig. 2, ho scelto, per gli esperimenti successivi, un tempo di incubazione di 20 min.

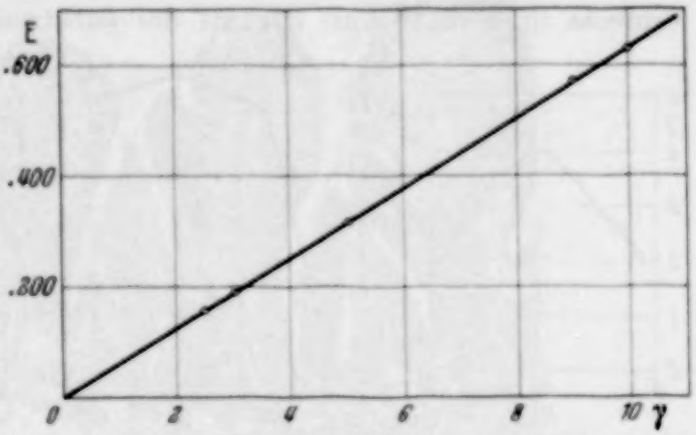

Fig. 1. Relazione tra densità ottica e concentrazione del fosforo. Sull'asse delle ascisse sono riportate le quantità di fosforo, espresse in γ; su quello delle ordinate i valori di estinzione (E) letti alla lunghezza d'onda di 720 mμ con lo Spettrofotometro Unicam SP. 600

2. Azione della concentrazione idrogenionica sulla velocità di reazione. Conducendo la reazione per 20 min, alla temperatura di 39° e variando il pH della soluzione regolatrice della reazione, si ottiene la curva della Fig. 3, dalla quale si ricava che l'attività fosfatasica raggiunge il massimo a pH 9.

3. Azione della temperatura sulla velocità di reazione. Lasciando inalterate le altre condizioni sperimentali e variando la temperatura del bagno di incubazione, si ottiene la curva della Fig. 4. L'andamento della curva dimostra che la velocità di reazione diviene massima a 49—50° di temperatura.

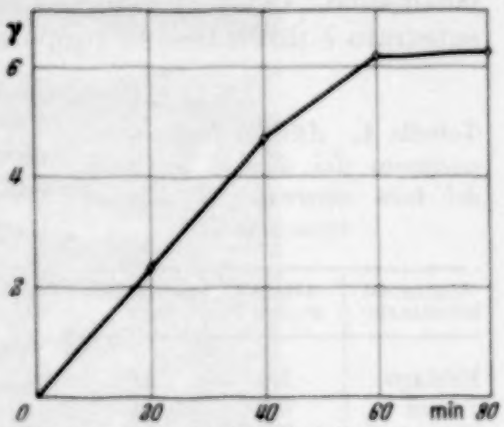

Fig. 2. Curva di attività della fosfomonoesterasi alcalina dell'estratto acquoso intestinale di *Murex trunculus* in funzione del tempo di incubazione. In ordinate: γ di fosforo liberato dal substrato (β-glicerofosfato di sodio) ad opera dell'enzima. In ascisse: minuti di incubazione

4. Azione della concentrazione enzimatica. Nella Fig. 5 è rappresentata la curva di idrolisi del β-glicerofosfato di sodio in funzione della concentrazione dell'enzima. I valori riportati in ascisse rappresentano le concentrazioni seguenti:

C_1 = 1 ml di concentrazione A + 3 ml di H_2O distillata (25%)
C_2 = 2 ml di concentrazione A + 2 ml di H_2O distillata (50%)
C_4 = concentrazione originale A = 1 mg di tessuto/5 μl H_2O (100%)

Nella Fig. 5 in ordinate è riportata l'attività fosfomonoesterasica espressa in γ di fosforo liberati dal substrato ad opera dell'estratto

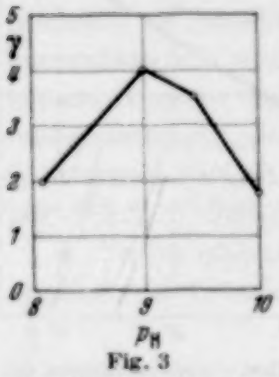

Fig. 3

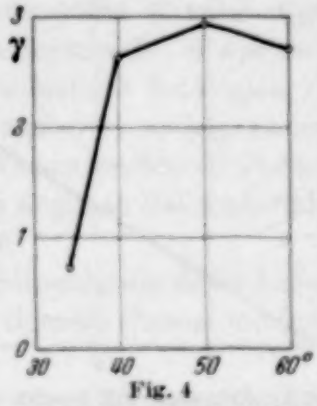

Fig. 4

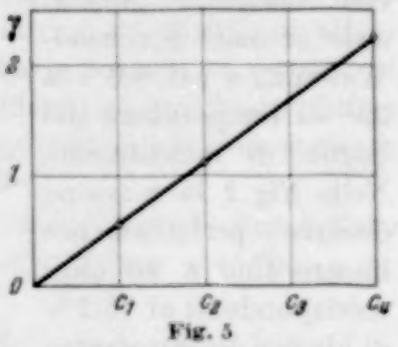

Fig. 5

Fig. 3. *Murex trunculus.* Fosfomonoesterasi alcalina dell'intestino. Azione della concentrazione idrogenionica sulla velocità di idrolisi del β-glicerofosfato di sodio. In ordinate: γ di fosforo. In ascisse: pH della soluzione regolatrice della reazione (glicina-soda secondo Sörenson-Walbum)

Fig. 4. Azione della temperatura sulla velocità di idrolisi del substrato ad opera della fosfomonoesterasi alcalina dell'intestino di *Murex trunculus.* In ordinate: γ di fosforo. In ascisse: temperatura di incubazione

Fig. 5. *Murex trunculus.* Attività fosfomonoesterasica dell'estratto acquoso intestinale. Azione della concentrazione enzimatica sulla velocità di idrolisi del substrato. In ordinate: γ di fosforo. In ascisse: concentrazioni enzimatiche. Altre spiegazioni nel testo

enzimatico. Come si può osservare nella Fig. 5, la velocità di idrolisi del substrato è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'enzima.

5. Analisi dell'attività enzimatica nei vari segmenti del tubo digerente. Stabilite le condizioni sperimentali ottimali, ho voluto ricercare l'esistenza di eventuali differenze dell'attività fosfomonoesterasica alcalina nei diversi segmenti. I risultati di una delle prove condotte sono riassunti nella Tabella 1.

Tabella 1. *Attività fosfomonoesterasica dei diversi segmenti del tubo digerente di Murex trunculus*

Segmento intestinale[1]	Attività in γ di P	Attività in %
Esofago	1,6	22,5
Tenue	7,1	100,0
Stomaco	2,5	35,2
Retto	0,6	8,4

[1] Per la nomenclatura dei vari segmenti intestinali cfr. Hirsch (1915).

Dall'esame della tabella si ricava che l'intestino tenue, compreso fra lo sbocco del condotto del «cieco» e il cosidetto stomaco, presenta il massimo di attività enzimatica; invece, gli altri segmenti, ed in particolare l'intestino terminale, manifestano un'attività molto meno intensa.

Ricerche istochimiche sulla fosfomonoesterasi alcalina

Le sezioni dei vari segmenti, tutte di 5 μ, venivano montate sullo stesso vetrino, affinchè la durata dell'incubazione e dei passaggi suc-

cessivi fosse ugale per tutte; in tal modo i risultati ottenuti sui diversi tratti intestinali erano comparabili con maggiore sicurezza.

Fig. 6. *Murex trunculus*. «Stomaco». Metodo di Gomori per la messa in evidenza della fosfatasi alcalina. Incubazione 15 min. La reazione appare localizzata nella zona basale delle ciglia. 80 ×

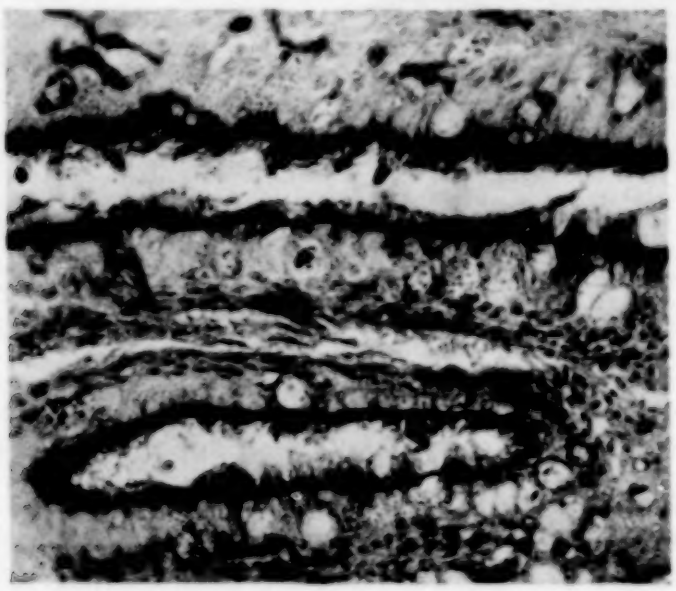

Fig. 7. *Murex trunculus*. «Intestino tenue». Metodo di Gomori. Incubazione 15 min. La reazione fosfatasica, localizzata alla base delle ciglia, è più intensa di quella rilevabile nelle cellule epiteliali dello stomaco (cfr. Fig. 6). 360 ×

Sono stati usati tempi di incubazione variabili da 2 min a 18 h 30 min[1]. A 2 min di incubazione la reazione non è apprezzabile; a 5 min

[1] Ho usato anche tempi di incubazione lunghi, tenendo presente la circostanza che in *Helix pomatia* (Guardabassi e Ferreri, 1951a; 1953b) era stato necessario

di incubazione il precipitato nero appare evidentissimo nell'epitelio di tutti i segmenti a livello della zona basale delle ciglia; solo nell'esofago la reazione è un po' meno intensa. Prolungando il tempo di incubazione (Fig. 6) fino a 60 min, la localizzazione della reazione non cambia; però la sua intensità va aumentando gradatamente, in particolare nell'intestino tenue (Fig. 7).

Fig. 8. *Murex trunculus*. «Stomaco». Metodo di Gomori. Incubazione 5 h 30 min. La reazione, sempre intensa alla base delle ciglia, compare anche nel citoplasma delle cellule epiteliali. 160 ×

A 30 min di incubazione incomincia a comparire una reazione nucleare; a 5 h 30 min si osserva una debole reazione citoplasmatica (Fig. 8), leggermente più intensa nel tenue. Tale reazione citoplasmatica appare molto più intensa con tempi lunghi di incubazione (18 h 30 min). Nella tonaca connettivale e in quella muscolare la reazione è assente.

Anche con tempi prolungati di incubazione non mi è stato possibile mettere in evidenza alcuna reazione Gomori-positiva in corrispondenza della regione dell'apparato interno e dei numerosi granuli acidofili, presenti in molte cellule epiteliali dell'esofago e del tenue (non mi risulta che tali elementi ricchi di granulazioni siano stati precedentemente descritti per l'epitelio intestinale di *Murex trunculus*).

Ricerche biochimiche sulla D-L-*alanil-glicina dipeptidasi*[1]

Per la composizione di queste prove mi sono attenuta strettamente a quanto riferiscono de Cesaris Coromaldi e Urbani Mistruzzi (1959), eccetto che per la prova riportata al n. 6 a pag. 250.

1. Curva di attività in funzione del tempo di incubazione. La Fig. 9 rappresenta il decorso dell'idrolisi del dipeptide promossa dall'estratto

ricorrere ad incubazioni protratte per mettere in evidenza una lieve attività nel citoplasma degli enterociti, e che, in linea generale, negli epiteli intestinali degli Invertebrati la reazione di Gomori sembra essere più debole che in quelli dei Vertebrati (Hébert, 1950; Guardabassi e Ferreri, 1951a; 1953b).

[1] La D-L-alanil-glicina mi è stata fornita dalla Casa Roche, che ringrazio vivamente.

acquoso dell'intestino di *Murex*. In queste condizioni sperimentali (1 mg di organo/45 μl di acqua distillata; pH 7,4 e temperatura 49°), la reazione, di ordine 0, è lineare fino a 60 min (96,7% di idrolisi). Negli esperimenti successivi, pertanto, ho usato un tempo di incubazione di 20 min.

2. Azione della concentrazione enzimatica sulla velocità di idrolisi. Nella Fig. 10 è riportata la curva di attività dipeptidasica in funzione

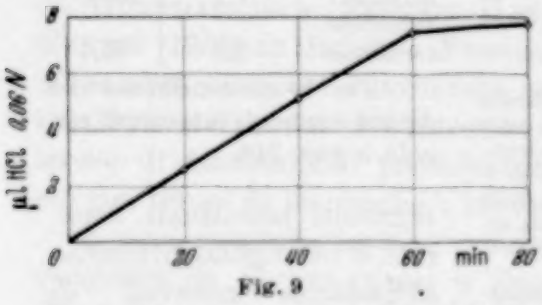

Fig. 9

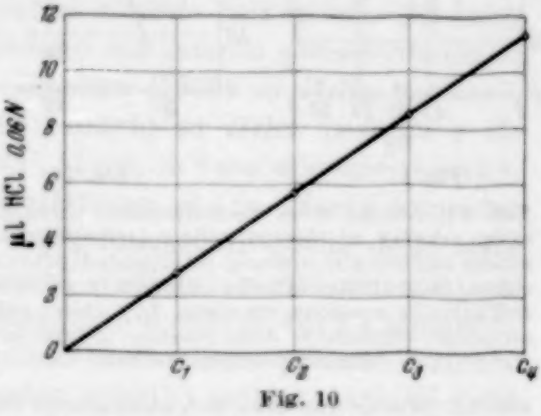

Fig. 10

Fig. 9. *Murex trunculus.* Attività dell'estratto acquoso intestinale sulla D-L-alanil-glicina. In ordinate: μl di HCl 0,06 N. In ascisse: minuti di incubazione

Fig. 10. *Murex trunculus.* Azione della concentrazione enzimatica sulla velocità di idrolisi della D-L-alanil-glicina. In ordinate: μl di HCl 0,06 N. In ascisse: concentrazioni dell'enzima. Ulteriori spiegazioni nel testo

della concentrazione dell'enzima. In ascisse sono riportate le concentrazioni seguenti:

C_1 = 1 ml di concentrazione A + 3 ml di H_2O (25%)
C_2 = 2 ml di concentrazione A + 2 ml di H_2O (50%)
C_3 = 3 ml di concentrazione A + 1 ml di H_2O (75%)
C_4 = concentrazione iniziale A = 1 mg organo/45 μl H_2O distillata (100%)

In ordinate è riportata l'attività enzimatica espressa in μl HCl 0,06 N. Dall'esame della Fig. 10 si rileva che l'idrolisi del dipeptide è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'enzima.

3. Azione della concentrazione idrogenionica sulla velocità di idrolisi. Con un tempo di incubazione di 20 min, alla temperatura di 48°, variando il pH della soluzione regolatrice della reazione, l'attività dipeptidasica dell'estratto acquoso di intestino di *Murex* presenta un massimo a pH 7,4 (Fig. 11).

4. Azione della temperatura sulla velocità di idrolisi. Mantenendo costanti le altre condizioni sperimentali, e variando, invece, la temperatura del bagno di incubazione, l'attività enzimatica segue il decorso della curva rappresentata nella Fig. 12, dalla quale appare evidente che la velocità di reazione è massima alla temperatura di 38°.

5. Attività della D-L-*alanil-glicina dipeptidasi nei vari segmenti del tubo digerente di Murex trunculus.* Ricavando gli estratti acquosi dai 4

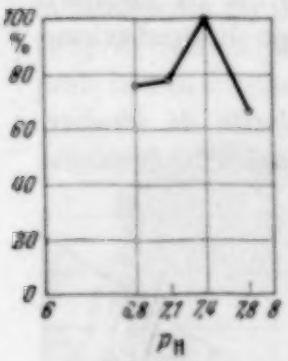

Fig. 11

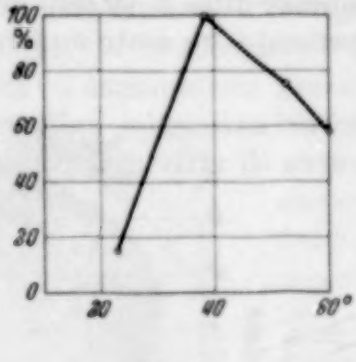

Fig. 12

Fig. 11. Azione della concentrazione idrogenionica sulla velocità di idrolisi della D-L-alanilglicina promossa dall'estratto acquoso intestinale di *Murex trunculus*. In ordinate: attività enzimatica espressa in % dell'attività massima ottenuta. In ascisse: pH della soluzione regolatrice della reazione (glicina-soda secondo Sörenson-Walbum)

Fig. 12. *Murex trunculus*. D-L-alanil-glicina dipeptidasi dell'intestino. Azione della temperatura sulla velocità di idrolisi del substrato. In ordinate: attività enzimatica espressa in % dell'attività massima ottenuta. In ascisse: temperatura di incubazione

Tabella 2. *Attività dipeptidasica nei diversi segmenti del tubo digerente di Murex trunculus*

Segmento intestinale[1]	Attività in μl HCl 0,06 N	Attività in %
Esofago	5,0	70,4
Tenue	6,2	87,3
Stomaco	7,1	100,0
Intestino terminale	3,2	45,1

[1] Per la nomenclatura dei diversi segmenti intestinali cfr. nota a pag. 246.

segmenti intestinali separati, si ottengono differenze abbastanza notevoli di attività. I risultati di una di queste prove sono riassunti nella tabella 2, nella quale appare evidente che lo «stomaco» presenta l'attività più elevata.

6. Azione di alcuni effettori sulla velocità di idrolisi della D-L-*alanil-glicina.* Ho sperimentato soltanto l'azione dei solfuri e del citrato di sodio[1]. I risultati sono riportati nella Tabella 3.

Tabella 3. *Azione di alcuni effettori sulla velocità di idrolisi della* D-L-*alanil-glicina dell'intestino di Murex trunculus*

	Attività in μl HCl 0,06 N	Attività in %	Inibizione in %
senza effettore .	10,4	100,0	—
H_2S	6,3	60,6	39,4
citrato di sodio	2,8	26,9	73,1

Dall'esame della tabella risulta evidente che entrambe le sostanze sperimentate inibiscono l'attività della D-L-alanil-glicina dipeptidasi estratta dal tubo digerente di *Murex trunculus*.

Discussione dei risultati

Le ricerche istochimiche condotte sul tubo digerente di *Murex trunculus* mi hanno permesso di dimostrare la presenza di fosfomonoesterasi alcalina nell'epitelio intestinale. La reazione, che compare già a

[1] Composizione delle prove: a 200 μl di enzima si univano 50 μl di soluzione M/10 di effettore. Indi si procedeva secondo le modalità già riferite (cfr. pag. 248).

5 min di incubazione, è localizzata in corrispondenza della zona basale delle ciglia. A 5 h 30 min la reazione di Gomori diviene positiva anche nei nuclei delle cellule epiteliali e comincia a comparire nel loro citoplasma, nel quale appare intensa solo con tempi molto lunghi di incubazione (18 h 30 min). Essa è assente nelle cellule mucipare, nelle cellule a granuli eosinofili dell'esofago e dell'intestino tenue, nella tonaca connettivale e in quella muscolare.

Questi reperti positivi sulla fosfatasi alcalina dell'epitelio del tubo digerente di *Murex trunculus* concordano con quanto precedentemente dimostrato per via istochimica da HÉBERT (1950) su *Helix aspersa*[1], da GUARDABASSI e FERRERI (1951a; 1953b) su *Helix pomatia* e da GENESI (1955) su *Patella* e *Fissurella*[2]. Però, in base alle mie ricerche, mi sembra di essere autorizzata ad affermare che in *Murex trunculus* l'attività fosfatasica dell'intestino è più intensa di quella delle altre specie di Gasteropodi precedentemente studiate, in quanto compare già con tempi di incubazione brevissimi ed a livello di tutti i segmenti.

I miei risultati, inoltre, concordano con quanto precedentemente osservato da GUARDABASSI e FERRERI (1953b) sulla negatività della Gomori-reazione nella regione dell'apparato interno delle cellule dell'epitelio intestinale.

L'assenza di attività fosfatasica a livello delle granulazioni acidofile, presenti in molte cellule dell'esofago e del tenue, fa ritenere che tali cellule non siano simili a quelle, di gran lunga meno diffuse, messe in evidenza da GUARDABASSI e FERRERI (1951a; 1953b) in una parte del tenue di *Helix pomatia*; infatti in quest'ultima specie i granuli di tali elementi reagiscono positivamente al metodo di Gomori.

Le prove biochimiche hanno fornito risultati concordanti con quelli delle ricerche istochimiche, dimostrando per la prima volta la presenza di fosfomonoesterasi alcalina nel tubo digerente di *Murex trunculus*. Inoltre, biochimicamente mi è stato possibile mettere in evidenza che:

1. l'attività della fosfomonoesterasi alcalina del tubo digerente di *Murex trunculus* è direttamente proporzionale alla concentrazione enzimatica;

2. con tampone glicina-soda, il massimo di attività è osservabile a pH 9 e a 49—50° di temperatura del bagno di incubazione;

---

[1] Però HÉBERT (1950) non ha trovato attività fosfatasica nell'epitelio intestinale di *Paturnus* e *Nereis*.

[2] Anche in *Planorbis corneus* (osservazioni inedite) mi è stato possibile mettere in evidenza istochimicamente la fosfomonoesterasi alcalina in corrispondenza della zona basale delle ciglia di alcuni segmenti (esofago, tenue, intestino terminale). La reazione di Gomori risulta, invece, negativa, anche dopo 14 h e 30 min di incubazione, nell'orletto striato del cosidetto Kaumagen, nel citoplasma delle cellule epiteliali di tutti i segmenti intestinali, nelle cellule mucipare e nelle tonache connettivali e muscolari del tubo digerente.

3. l'attività fosfatasica è diversa nei vari segmenti; in particolare, essa è molto intensa nel tratto di intestino compreso fra lo sbocco del „cieco" e il cosidetto stomaco.

Per via istochimica non mi è stato possibile mettere in evidenza in modo netto le differenze di attività riscontrate biochimicamente nei vari segmenti. Infatti, anche con tempi molto brevi di incubazione (5 min), la reazione compare in tutti i segmenti con la stessa localizzazione (zona basale delle ciglia); soltanto nell'intestino tenue è apprezzabile una reazione leggermente più intensa (Fig. 7).

Una lievissima differenza è riconoscibile anche con tempi lunghi di incubazione: a 5 h 30 min, la reazione del citoplasma delle cellule epiteliali dell'intestino tenue appare debolmente più intensa di quella delle cellule degli altri segmenti, in particolare di quella delle cellule epiteliali dell'esofago. In base a quest'ultimo reperto, che potrebbe imputarsi a diffusione dell'enzima (cfr. Hébert, 1950) piuttosto che a una sua maggiore distribuzione, non posso affermare in modo assoluto che le differenze di attività dimostrate biochimicamente siano osservabili anche istochimicamente.

Ritengo che tale mancato accordo fra i risultati sia da imputarsi al diverso spessore della parete del tubo digerente: l'estratto enzimatico ricavato dall'intestino tenue è formato prevalentemente da epitelio, poichè le tonache muscolari e connettivali di questo segmento sono molto sottili. Invece, lo stomaco e l'intestino terminale presentano, esternamente all'epitelio, tonache connettivali e muscolari ben sviluppate; pertanto nell'estratto acquoso la componente epiteliale, sede dell'attività enzimatica, è molto scarsa. Nell'esofago le tonache connettivali e muscolari sono alquanto ridotte, ma sono abbondantissime le cellule mucose prive di attività fosfatasica.

Inoltre le prove biochimiche mi hanno permesso di dimostrare per la prima volta che:

1. in tutto il tubo digerente di *Murex trunculus* è dimostrabile una D-L-alanil-glicina dipeptidasi;

2. l'attività dipeptidasica è direttamente proporzionale alla concentrazione enzimatica ed è massima a pH 7,4 e a 38° di temperatura del bagno di incubazione;

3. l'attività dipeptidasica varia nei diversi segmenti del tubo digerente (è massima nello «stomaco» e minima nell'intestino terminale);

4. la dipeptidasi enterica di *Murex trunculus* è inibita dai solfuri e dai citrati.

L'unico reperto positivo (ottenuto con una metodica del tutto particolare) sulla presenza di fermenti proteolitici nel canale digerente di Molluschi Gasteropodi è fornito da Abderhalden e Heise (1909). Questi AA. condussero una ricerca su molte specie di Invertebrati (fra

cui un Mollusco Opistobranco[1]), saggiando le proprietà proteolitiche di tutto il corpo dell'animale o del tubo digerente. L'analisi era condotta immergendo o l'animale *in toto* o l'intestino (previa eliminazione del contenuto enterico) in una soluzione 5‰ di Peptone Roche e ricercando, a varia distanza di tempo, la deposizione di cristalli di tirosina (amino-acido difficilmente solubile in acqua) sulla mucosa intestinale. E' ovvio che tale ricerca, pur avendo fornito risultati positivi sulla presenza, nel tubo digerente di una specie di Molluschi, di un enzima ad azione proteolitica sul Peptone Roche, non è paragonabile nella sua condotta alla mia indagine biochimica.

Le attuali ricerche sulla D-L-alanil-glicina dipeptidasi del tubo digerente di *Murex trunculus* dimostrano che questo enzima, pur rivelando una specificità di substrato, agisce a un pH che è tipico della maggior parte delle dipeptidasi. Infatti, MANSOUR-BEK (1934) ha dimostrato per la glicin-glicina dipeptidasi delle ghiandole annesse al tubo digerente di *Murex anguliferus* un pH *optimum* = 8 e ROSÉN (1935) ha trovato a pH 7,6 il massimo di attività di una aminopolipeptidasi dell'epatopancreas di *Helix pomatia*. Inoltre la dipeptidasi dell'intestino di *Murex trunculus* è inibita da solfuri e citrati (cfr. LENTI, 1954, per la leucil-peptidasi in generale e ROSÉN, 1935, per l'aminopolipeptidasi dell'epatopancreas di *Helix pomatia*).

Per quanto riguarda il pH ottimale di azione dell'enzima proteolitico da me dimostrato nell'intestino di *Murex* e di quelli precedentemente ricercati da molti AA. nelle ghiandole dell'apparato digerente dei Gasteropodi, si tenga presente che già MANSOUR-BEK (1934) rivelò come il valore del pH *optimum* di tali fermenti sia lontano da quello del succo digerente. Penso, pertanto, di potermi associare all'opinione di BUDDENBROCK (1956), secondo il quale la maggior parte dei fermenti proteolitici dell'epatopancreas (e, nel mio caso, dell'intestino) agirebbe intracellularmente.

Comunque, pur non potendo affermare che la dipeptidasi dello intestino di *Murex trunculus* venga escreta dalle cellule epiteliali, mi sembra giustificato concludere, in base ai miei reperti attuali e a quelli precedenti sulla lipasi, che anche in questa specie (come in *Helix pomatia* e in *Planorbis corneus*) l'epitelio intestinale partecipi in qualche modo ai processi digestivi. Inoltre la presenza di fosfatasi nell'epitelio intestinale di *Murex* potrebbe essere messa in rapporto con processi di assorbimento, come è noto da tempo per i Vertebrati, e come è già stato

[1] Gli AA. non riferiscono il nome latino della specie esaminata, limitandosi a indicarla come «Gartenschnecke», appartenente ai Gasteropodi Opistobranchi. Secondo CLAUS (1932), invece, «Gartenschnecke» corrisponde a *Helix hortensis* (Gasteropodi Polmonati).

supposto per *Helix pomatia*[1], dove, oltre all'attività fosfatasica, è stata dimostrata la possibilità di assorbimento dei grassi (GUARDABASSI e FERRERI, 1951 b; 1952; 1953 a, b)

Pertanto, queste considerazioni mi inducono a ritenere che sarebbe molto utile rivedere per i Molluschi Gasteropodi tutti i vecchi dati (cfr. per la bibliografia FERRERI, 1958 b) sulla produzione di enzimi e sull'assorbimento, attività assegnate dai vecchi AA. esclusivamente alle ghiandole annesse all'apparato digerente, ed attribuire al canale digerente funzioni più complesse di quella di un semplice trasporto meccanico del cibo ingerito.

Addendum

Questo lavoro era già pronto per la stampa, quando ho avuto occasione di prendere visione di una serie di ricerche eseguite da MAGALHÃES NETO (1953 a, b) e da MAGALHÃES NETO e ALMEIDA (1953, 1954, 1955, 1959) sul patrimonio enzimatico dell'apparato digerente di un Gasteropode Planorbide. Nello stomaco di *Australorbis glabratus* gli AA. hanno messo in evidenza biochimicamente la presenza di una invertasi, di un'α-glucosidasi (entrambe a pH ottimale = 5,8), di un'amilasi (pH 7,4) e di una lipasi (pH 5,6); nell'epatopancreas della stessa specie gli AA. hanno riconosciuto un'amilasi (pH 5,8) e una lipasi (pH 5,6).

Mi interessa sottolineare il reperto sul pH ottimale (5,6) delle lipasi dimostrate biochimicamente nell'epatopancreas (MAGALHÃES NETO e ALMEIDA, 1955) e nello stomaco (MAGALHÃES NETO e ALMEIDA, 1959). Gli AA. fanno rilevare che in un altro Gasteropode *(Helix)* è stata reperita una lipasi epatopancreatica a pH ottimale = 6 (KRIJGSMAN, 1925, citato da PROSSER, 1950). In realtà KRIJGSMAN nel 1928 (e non nel 1925) ha studiato con metodo stalagmometrico la lipasi epatopancreatica di *Helix*, lavorando a pH 7,17, senza ricercarne l'optimum di azione. KUNTARA (1934), invece, ha trovato che la lipasi epatopancreatica di *Helix* presenta il massimo di attività a pH 9.

Nelle mie ricerche su *Helix* (FERRERI, 1957; 1958 a, b), di cui gli AA. non sono venuti a conoscenza, e in quelle su *Murex* e *Planorbis* (FERRERI, e DUCATO 1959 a, b) ho dimostrato per la lipasi di tutto il tubo digerente un pH ottimale in ambiente nettamente alcalino (9,8), molto vicino a quello dimostrato da KUNTARA (1934) per la lipasi epatopancreatica di *Helix*.

Infine, gli AA. affermano che secondo SCHEER (1948) nel succo gastrico dei Gasteropodi non esisterebbero enzimi. In realtà SCHEER

[1] Anche in *Octopus vulgaris* è stata dimostrata istochimicamente (ARVY, 1960) la presenza di fosfatasi alcalina in corrispondenza del polo apicale delle cellule del segmento posteriore del tubo digestivo; l'A. interpreta il suo reperto, contrario a quello precedente di CAPURRO e ZACCHEO (1953), come segno di una partecipazione di questo segmento intestinale ai processi di digestione e assorbimento.

(1948) fa questa osservazione esclusivamente per *Lymnaea stagnalis*, poichè era noto da tempo che molti enzimi, prodotti dalle ghiandole salivari e dall'epatopancreas, vengono riversati nel succo gastrico dei Gasteropodi (cfr. SCHEER, 1948; BUDDENBROCK, 1956).

Zusammenfassung

Die alkalische Phosphomonoesterase des Darmkanals von *Murex trunculus* L. wurde von der Verfasserin biochemisch und histochemisch, die D-L-Alanyl-glycinpeptidase nur biochemisch untersucht.

Die biochemischen Untersuchungen über die alkalische Phosphomonoesterase nach der Bodansky-Methode lieferten folgende Ergebnisse:

1. Im wäßrigen Extrakt des Darmkanals von *Murex trunculus* besteht eine Phosphatase-Aktivität im alkalischen Bereich.

2. Die optimalen Experimentalbedingungen für dieses Enzym sind: pH 9 (Glyzin-Natronlauge-Puffer nach SÖRENSON-WALBUM); Temperatur 49—50° C.

3. Die Hydrolysengeschwindigkeit des Substrates (Natrium-β-Glycerophosphat) ist direkt proportional der enzymatischen Konzentration.

4. Es bestehen wesentliche Unterschiede in der Tätigkeit der verschiedenen Segmente des Darmkanals: Im sog. Dünndarm ist die Tätigkeit viel ausgeprägter als in den anderen Abschnitten (Oesophagus, Magen, Enddarm).

Die histochemischen Untersuchungen über die alkalische Phosphomonoesterase lieferten immer positive Ergebnisse am ganzen Darmepithelium von *Murex trunculus*. Die Gomori-Reaktion, die in allen Abschnitten schon bei kurzen Inkubationszeiten (5 min) auftritt, scheint an der Zone der Wimperbasalkörperchen lokalisiert. Bei längeren Inkubationszeiten tritt auch eine zytoplasmatische Reaktion ein.

Außerdem war es durch die Mikromethode nach LINDERSTRØM-LANG und HOLTER möglich, das erstemal zu beweisen, daß der wäßrige Extrakt des Darmkanals von *Murex trunculus* das D-L-Alanyl-glycin spaltet. Diese Peptidase-Aktivität ist direkt proportional der Fermentkonzentration und wirkt bei pH 7,4 und 38° Temperatur optimal; sie wird durch Natriumcitrat und H_2S gehemmt und erscheint im „Magen" stärker als in den übrigen Abschnitten des Darmkanals.

Die Verfasserin nimmt im Gegensatz zu der üblichen Ansicht an, daß der Darmkanal von *Murex trunculus* an den Verdauungs- und Resorptionsprozessen beteiligt sein kann.

Bibliografia

ABDERHALDEN, E., u. R. HEISE: Über das Vorkommen peptolytischer Fermente bei den Wirbellosen. Z. physiol. Chem. **63**, 136—138 (1909).

ARVY, L.: Contribution à l'histo-enzymologie du tube digestif chez *Octopus vulgaris* Lamarck (Céphalopodes). Arch. Anat. micr. Morph. exp. **49**, 229—239 (1960).

Bargoni, N.: Esercitazioni di Biochimica. Torino: Libreria Editrice Universitaria Levrotto e Bella 1954.

Brock, F.: Analyse des Beute- und Verdauungsfeldes der Wellhornschnecke *Buccinum undatum* L. Zool. Anz. Suppl. **6**, 234—250 (1933).

Buddenbrock, W. v.: Vergleichende Physiologie. Bd. III: Ernährung, Wasserhaushalt und Mineralhaushalt der Tiere. Basel: Birkhäuser 1956.

Capurro, G. M. S., e D. Zaccheo: Ricerche sulla presenza di fosfatasi alcalina in tessuti ed organi di Molluschi *(Octopus vulgaris)*. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **29**, 382—385 (1953).

Cesaris Coromaldi, L. de, e L. Urbani Mistruzzi: Micrometodi per la determinazione di alcuni enzimi (proteasi, amilasi, fosfatasi, lipasi) e dei relativi substrati. Rend. Sci. Ist. Lomb. **93**, 163—213 (1959).

Claus, C.: Lehrbuch der Zoologie, 10. Aufl. Berlin u. Wien: Springer 1932.

Dessaux, G.: Sur les phosphomonoestérases de l'hépatopancréas d'*Helix pomatia* L. C. R. Soc. Biol. (Paris) **142**, 337—340 (1948).

Ferreri, E.: Attività esterasica nell'epitelio intestinale di *Helix pomatia*. Reperti biochimici ed istochimici. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **33**, 1140—1142 (1957).

— L'attività lipasica nell'epitelio intestinale di *Helix pomatia*. Nota II. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **34**, 379—382 (1958a).

— Ricerche biochimiche ed istochimiche sull'attività lipasica dell'epitelio intestinale di *Helix pomatia*. Z. vergl. Physiol. **41**, 373—389 (1958b).

Ferreri, E., e L. Ducato: La lipasi nel tubo digerente di *Murex trunculus* e di *Planorbis corneus*. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **35**, 531—532 (1959a).

Ferreri, E., e L. Ducato: Vergleichende biochemische und histochemische Untersuchungen über die lipolytische Tätigkeit des Darmkanalepitheliums von *Planorbis corneus* und *Murex trunculus*. Z. Zellforsch. **51**, 65—77 (1959b).

Gautrelet, J.: Éléments de techniques physiologiques. Paris: Masson & Cie. 1932.

Genesi, M.: Localizzazione delle fosfatasi acida ed alcalina e di sostanze Schiff-positive in Lamellibranchi e Gasteropodi marini *(Mytilus, Patella, Fissurella)*. Riv. Biol. **47**, 97—106 (1955).

Guardabassi, A., e E. Ferreri: La fosfatasi alcalina nell'intestino di *Helix pomatia*. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **27**, 1039—1040 (1951a).

— — L'assorbimento dei lipidi nell'intestino di *Helix pomatia*. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **27**, 1037—1038 (1951b).

— — Assorbimento di lipidi nell'intestino di *Helix pomatia* isolato in soluzione fisiologica. Boll. Soc. ital. Biol. sper. **28**, 1388—1390 (1952).

— — Contributo allo studio dell'assorbimento dei lipidi: esperimenti su tratti intestinali di *Helix pomatia*, isolati e sopravviventi in soluzione fisiologica. Arch. Sci. biol. (Bologna) **37**, 287—305 (1953a).

— — Istofisiologia dell'apparato digerente di *Helix pomatia*. Arch. Zool. ital. **38**, 61—156 (1953b).

Hébert, S.: Les phosphatases alcalines de l'intestin. Étude histochimique expérimentale. Arch. Biol. (Liège) **61**, 235—289 (1950).

Hirsch, G. C.: Die Ernährungsbiologie fleischfressender Gastropoden *(Murex, Natica, Pterotrachea, Pleurobranchea, Tritonium)*. 1. Teil. Makroskopischer Bau, Nahrung, Nahrungsaufnahme, Verdauung, Secretion. Zool. Jb., Abt. allg. Zool. u. Physiol. **35**, 359—504 (1915).

Krijgsman, B. J.: Arbeitsrhythmus der Verdauungsdrüsen bei *Helix pomatia*. I. Teil: Die natürlichen Bedingungen. Z. vergl. Physiol. **2**, 264—296 (1925).

— Arbeitsrhythmus der Verdauungsdrüsen bei *Helix pomatia*. II. Teil: Sekretion, Resorption und Phagocytose. Z. vergl. Physiol. **8**, 187—280 (1928).

Krüger, P.: Vergleichender Fermentstoffwechsel bei niederen Tieren. Ergebn. Physiol. **35**, 538—572 (1933).

Kuntara, W.: Beitrag zur Kenntnis der Lipase aus dem Darmsaft der Weinbergschnecke. Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **225**, 169—188 (1934).

Lenti, C.: Gli enzimi. Torino: Edizioni Minerva 1954.

Magalhães Neto, B.: Sôbre a presença de uma invertase no estômago de *Australorbis glabratus*. Publ. av. Inst. Aggeu Magalhães. **2**, 1—4 (1953a).

— O equipamento enzimatico do aparelho digestivo de *Australorbis glabratus*. I. Invertase do estômago. Bol. Fac. Fil. Ciên. Letr. Univ. Sao Paulo, Zool. **18**, 103—108 (1953b).

—, e A. M. Almeida: Sôbre a presença de uma amilase gastrica em *Australorbis glabratus*. Publ. av. Inst. Aggeu Magalhães. **2**, 115—120 (1953).

— — O equipamento enzimatico do aparelho digestivo de *Australorbis glabratus*. II. Amilase da glândula digestiva. Publ. av. Inst. Aggeu Magalhães. **31**, 131—136 (1954).

— — O equipamento enzimatico do aparelho digestivo de *Australorbis glabratus*. III. Lipase da glândula digestiva. Publ. av. Inst. Aggeu Magalhães. **4**, 73—77 (1955).

— — O equipamento enzimatico do aparelho digestivo de *Australorbis glabratus*. IV. Lipase do estômago. An. Soc. Biol. Pernambuco **16**, 213—217 (1959).

Manigault, P.: Recherches sur le calcaire chez les Mollusques. Phosphatase et précipitation calcique. Histochimie du calcium. Thèses Fac. Sciences, Univers. Paris 1939.

Mansour Bek, J. J.: Über die proteolytischen Enzyme von *Murex anguliferus* Lamk. Z. vergl. Physiol. **20**, 343—369 (1934).

Morton, J. E.: The ecology and digestive system of the Struthiolariidae (Gastropoda). Quart. J. micr. Sci. **92**, 1—25 (1951).

Prosser, C. L.: Comparative animal physiology. Philadelphia and London: W. B. Saunders Company 1950.

Rosén, B.: Die Proteinasen und die Aminopolypeptidase der Mitteldarmdrüse von *Helix pomatia* L. Z. vergl. Physiol. **21**, 176—187 (1935).

— Vergleichende Studien über die Proteinasen von Gastropoden und decapoden Crustaceen. Z. vergl. Physiol. **24**, 602—612 (1936).

Scheer, B. T.: Comparative physiology. New York: J. Wiley & Sons 1948.

Dr. E. Ferreri,
Istituto di Anatomia comparata e Istologia dell'Università di Torino,
Torino, Via Giolitti 34 (Italia)

Zeitschrift für vergleichende Physiologie 44, 258—261 (1961)

Aus dem Biologischen Institut Madaus, Köln

EINIGE DATEN ZUM BLUTBILD DES ROTHIRSCHES (*CERVUS ELAPHUS* L.)

Von

GÜNTHER VOGEL, ROLF MADAUS und HANS-DIETER LEHMANN*

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 13. Dezember 1960)

Bei der Untersuchung tierartlicher Unterschiede der Saponinempfindlichkeit von Erythrozyten wurde auch mit Blutzellen des Rothirsches (*Cervus elaphus* L.) gearbeitet. Hirsche nehmen bekanntlich vor allem im Winter reichlich Roßkastanien auf; möglicherweise ist die relative Unempfindlichkeit dieser Tiere gegenüber großen Roßkastanien- und -saponinmengen unter anderem darauf zurückzuführen, daß eventuell resorbiertes Saponin (Aescin) nur gering hämolysierend wirkt. Da Daten über das Blut von Cervus elaphus L. kaum vorliegen, wurden neben der Saponinempfindlichkeit der Erythrozyten noch andere Größen gemessen.

Methodik

Die Bestimmung des Hämatokrit erfolgte in Wintrobe-Röhrchen, die des Hämoglobins mit dem Zeißschen Hämometer. Der Durchmesser der Erythrozyten wurde mittels Okularmikrometer am fixierten Blutausstrich an insgesamt 300 Zellen (3 Tiere) gemessen. Zur Differenzierung der weißen Blutzellen wurden (3 Tiere) je 400 Zellen ausgezählt. Die Bestimmung von Natrium und Kalium im Plasma wurde flammenphotometrisch vorgenommen, die des gesamten und freien Cholesterins mit der Digitonin-Methode. Die Auftrennung der Plasmaproteine erfolgte mittels Papier-Elektrophorese, die osmotische Resistenz der Erythrozyten wurde in üblicher Weise gemessen. Die Bestimmung der Saponinempfindlichkeit (Saponin aus Gypsophila paniculata Rhizom, Schweiz. Standard-Saponin; Saponin aus Semen Aesculi hippocastani, Aescin) erfolgte nach den Vorschriften der Schweizerischen Pharmacopoe (Pharmacopoea Helvetica V, Suppl. II, S. 269, Bern 1955). Als Maß der hämolysierenden Wirksamkeit einer Substanz gilt der hämolytische Index, der wie folgt definiert ist: bestimmt wird jenes Volumen (ml) eines 1:100 verdünnten Vollblutes, daß durch 1 g Lytikum zur Totalhämolyse gebracht wird. Um den möglichen saponinbindenden Einfluß von Plasmakonstituenten auszuschalten, wurde der hämolytische Index auch an einer Suspension (gleiche Zellzahl wie oben) gewaschener Erythrozyten gemessen. In beiden Versuchsanordnungen betrug die Zellzahl $10^6/mm^3$.

Wir hatten Blut von 7 Hirschen zur Verfügung, deren Gewicht nur geschätzt werden konnte (25—35 kg). Es handelte sich um jugendliche Tiere beiderlei Geschlechts. Die Versuche fanden zwischen Mai und November 1960 statt. Die Tiere kamen zunächst in einen Zwangsstand oder eine Kiste, wo sie eine intramuskuläre Injektion von Chlorpromazin erhielten. Die wirksame Einzeldosis

* Unter Mitwirkung der med.-techn. Assistentin, Fräulein SYBILLE BUCHHEIM.

beträgt 1,0—1,2 mg/kg, die Tranquillisierung hat ihr Maximum 30—40 min post inj. Zu diesem Zeitpunkt bereitete das Werfen der Tiere keine Schwierigkeit, die Blutentnahme geschah durch Punktion der V. jugularis*. Das Blut wurde heparinisiert und in Thermosflaschen bei 37° C aufbewahrt, die Versuche wurden 3—4 Std später angesetzt. Wir verzichteten auf eine statistische Bearbeitung der Meßdaten, da den in der Tabelle angegebenen Mittelwerten nur 3—7 Versuche bzw. Meßwerte zugrunde liegen.

Ergebnisse

Die gewonnenen Daten sind in der folgenden Tabelle und Abbildung zusammengefaßt. (In Klammer gesetzt ist die Zahl der Tiere.)

Tabelle

Hämatokrit %	Hb g-%	Erythrozyten 10^6/mm³	Hb_E $g \times 10^{-12}$	Ery ⌀ μ	Leukozyten je mm³
42,5 (4)	13,6 (4)	11,0 (7)	12,4 (4)	4,4 (3)	3900 (7)

Differentialblutbild (3)							Plasma	
Basophile	Eosinophile	Stabkernige	Segmentkernige	Große Lymphozyten	Kleine Lymphozyten	Monozyten	Na (mMol/l)	K
0,4	2,0	1,4	10,3	44,7	40,1	1,0	162,7 (3)	6,1 (3)

Gesamt-	Freies	Albumin	Plasmaproteine (3)						
			Globuline %						
Plasma-Cholesterin mg-%		%	α_1	α_2	Ges.-α	β_1	β_2	Ges.-β	γ
75,3 (3)	15,3 (3)	47,4	7,5	7,2	17,7	14,3	4,2	18,5	16 4

Osmotische Grenzkonzentration % NaCl (2)	Hämolytischer Index Schweiz. Stand. Sap.		Hämolytischer Index Aescin	
	verdünntes Vollblut	gewaschene Erys	verdünntes Vollblut	gewaschene Erys
0,414	1:54000 (3)	1:91000 (3)	1:178000 (3)	1:413000 (3)

Diskussion

Der Hirsch dürfte unter den Haussäugetieren am ehesten mit den kleinen Wiederkäuern Schaf und Ziege vergleichbar sein. Sein Hämatokritwert liegt in bekannten Größenordnungen; er ist etwas höher als bei Schaf und Ziege. Das gleiche gilt für den Hämoglobingehalt des Blutes. Erythrozytenzahl, -durchmesser und Hb_E-Werte entsprechen denen von Schaf und Ziege[3–5]. Der Hirsch hat runde bikonkave

* Den Herren Dr. Windecker und Dr. Zeller, Zoologischer Garten Köln, und Dr. Müller und Dr. Haas, Zoologischer Garten Wuppertal, danken wir für ihr Entgegenkommen und ihre Hilfsbereitschaft.

Erythrozyten. Die Leukozytenzahl mit knapp 4000/mm³ liegt auffallend niedrig, was den an vielen Haussäugetieren gewonnenen Daten widerspricht, dagegen wird ein absolutes und relatives Überwiegen der Lymphozyten an fast allen pflanzenfressenden und wiederkäuenden Haussäugetieren beobachtet[1,2,4,6]. Der Plasmagehalt an Natrium und Kalium ist ohne Besonderheit[5], die niedrige Plasmakonzentration an freiem und Gesamtcholesterin entspricht Befunden, wie sie allgemein an Pflanzenfressern erhoben werden. Der Albumin-Globulin-Quotient entspricht dem der meisten Haussäugetiere, die osmotische

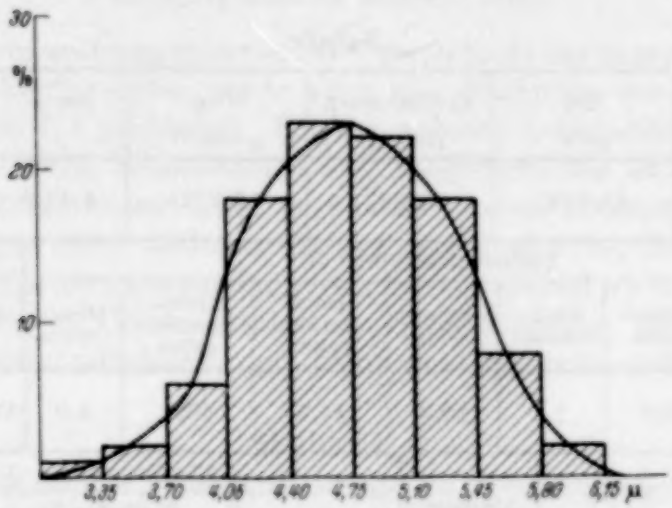

Abb. 1. Häufigkeitsverteilung der Durchmesser von Hirscherythrozyten. Messung von 100 Zellen im fixierten Ausstrich (1 Tier, ♀, etwa 35 kg)

Resistenz der Hirsch-Erythrozyten ist regelrecht. Dagegen ist die Resistenz von Erythrozyten des Hirsches gegenüber den beiden geprüften Saponinen geringer als die von Schaf, Rind oder Pferd. Wird die hohe Empfindlichkeit der Erythrozyten von Cervus elaphus L. gegenüber Saponin auf den Cholesteringehalt der Zellmembran bezogen, dann sprechen unsere Werte für einen relativ niedrigen Cholesteringehalt. Wenn der Hirsch oral aufgenommenes Roßkastaniensaponin gut verträgt, dann hat diese Besonderheit mit einer erhöhten Saponinresistenz seiner Erythrozyten nichts zu tun. Wahrscheinlich wird im Pansenchemismus das Saponin zum Sapogenin gespalten, das keine lokal reizenden, plasmatoxischen und hämolysierenden Eigenschaften mehr besitzt.

Zusammenfassung

Es werden einige Daten zur Kenntnis des Blutbildes vom Rothirsch (*Cervus elaphus* L.) mitgeteilt. In hämatologischer Beziehung besteht eine weitgehende Übereinstimmung mit den kleinen Wiederkäuern

Schaf und Ziege, nach Leukozytenzahl und Saponinempfindlichkeit der Erythrozyten weist das Hirschblut deutliche Unterschiede gegenüber domestizierten Wiederkäuern auf.

Literatur

[1] Ketz, H. A., G. Vogel u. W. Westphal: Vergleichende Untersuchungen über die Steuerung des weißen Blutbildes in Abhängigkeit von der Alkalireserve des Blutes. Zbl. Vet.-Med. **3**, 44, 149 (1956).

[2] Liesegang, E., u. G. Vogel: Orientierende Versuche über Veränderungen des weißen Blutbildes verschiedener Tierarten in Abhängigkeit von Nahrungsaufnahme und Nahrungsentzug. Arch. Tierernähr. Beih. **5**, 50 (1954).

[3] Ponder, E.: Hemolysis and related phenomena. New York 1948.

[4] Scheunert, A., J. Brüggemann, V. Horn u. H. Hill: Lehrbuch der Veterinär-Physiologie. Berlin u. Hamburg 1957.

[5] Vogel, G., u. H. A. Ketz: Vergleichende Untersuchungen zum Natrium-, Kalium- und Glukosegehalt von Serum und Erythrozyten. Z. vergl. Physiol. **38**, 558 (1956).

[6] Wirth, D.: Grundlagen einer klinischen Hämatologie der Haustiere. Wien 1950.

Prof. Dr. G. Vogel, Köln-Merheim, Biologisches Institut Dr. Madaus

Zeitschrift für vergleichende Physiologie 44, 262—267 (1961)

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Wien
(Vorstand: Prof. Dr. G. Schubert)

ZUR NETZHAUTFUNKTION DES ALPENMURMELTIERS *MARMOTA MARMOTA* (L.)

Von

H. Bornschein

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Dezember 1960)

Die Familie der Hörnchen *(Sciuridae)* ist für vergleichende sinnesphysiologische Untersuchungen insofern von besonderem Interesse, als sich in ihr neben dämmerungsaktiven Tieren auch extreme Tagtiere finden (Walls 1942). So gehören dieser Familie sämtliche bisher bekannten Säugerarten an, die eine stäbchenfreie Netzhaut aufweisen. Für die Grundlagenforschung bieten diese reinen Zapfennetzhäute besondere Möglichkeiten, da die Komplikationen wegfallen, die sich bei den gemischten Netzhäuten der üblichen Laboratoriumstiere und des Menschen aus der Überlagerung bzw. Wechselwirkung zweier verschiedener Rezeptorsysteme ergeben. In den letzten Jahren wurden daher sowohl *Sciurus* als auch *Citellus* hinsichtlich ihrer retinalen Funktion elektrophysiologisch untersucht, während dies bei *Marmota* bisher noch nicht der Fall war. Eine Ausdehnung der Studien auf diese Gattung schien aus mehreren Gründen von Interesse, wobei neben rein vergleichenden und ökologischen Gesichtspunkten zu berücksichtigen war, daß es sich um die erste Säugernetzhaut handelt, die als sicher stäbchenfrei erkannt wurde (Rochon-Duvigneaud 1930). Wenngleich sich die Untersuchung auf ein einziges Exemplar der Art *Marmota marmota* (L.) beschränken mußte, so erreichen die Ergebnisse doch insofern eine gewisse Repräsentanz, als sie mit den unter identischen Reizbedingungen bei mehreren Exemplaren einer verwandten Gattung *(Citellus)* erhaltenen Befunden weitgehend übereinstimmen.

Methodik

Das untersuchte Tier (erwachsenes ♀, 2,45 kg) befand sich in Urethannarkose (2,0 g/kg intraperitoneal) und war gegen Wärmeverlust geschützt. Nach Spreizung der Lider durch Suturen und Erweiterung der Pupille mit Atropin wurde je eine Pt-Drahtschlinge (0,1 mm ∅) intralamellar durch die Kornea und durch das Subkutangewebe am Scheitel geführt (Korneal- und Bezugselektrode); die Erdelektrode befand sich im Maul des Tieres. Die Verstärkung der abgeleiteten Potentiale erfolgte mittels einer Gleichstromverstärkeranlage (J. F. Tönnies, Freiburg) mit RC-Kopplung in der Vorstufe, wobei die gewählte Zeitkonstante (0,5 sec) für eine verzerrungsfreie Registrierung der untersuchten raschen Schwankungen ausreichte (Doppelstrahl-KSO, Recordine von J. F. Tönnies mit 100 mm/sec Filmgeschwindig-

keit). Die weißen Lichtreize wurden mit einem elektronischen Lichtstimulator (Grass PS-1) in gleicher Weise wie in früheren Untersuchungen (Bornschein und Szegvári 1958; Bornschein und Tansley 1961) erzeugt (Xenon-Gasentladungslampe, Reizfeld 13 cm ∅, 30 cm vor dem Auge, Blitzdauer bei Einzel-, Doppel- und Flimmerreizung etwa 10^{-5} sec, maximale Reizstärke etwa 3×10^7 lm/m² in der Eintrittspupille des untersuchten Auges). Da das Einschalten der Raumbeleuchtung keinen nennenswerten Einfluß auf das nach 1stündiger Dunkeladapation registrierte ERG ausübte, wurden die Aufnahmen zwar im Dunkeln, aber ohne längere Adaptationspausen durchgeführt.

Ergebnisse

Das durch kurze Einzelblitze ausgelöste Elektroretinogramm (ERG) des Murmeltiers ist in Abb. 1 für verschiedene Reizintensitäten dargestellt. Die aus negativer a-Welle und positiver b-Welle bestehende

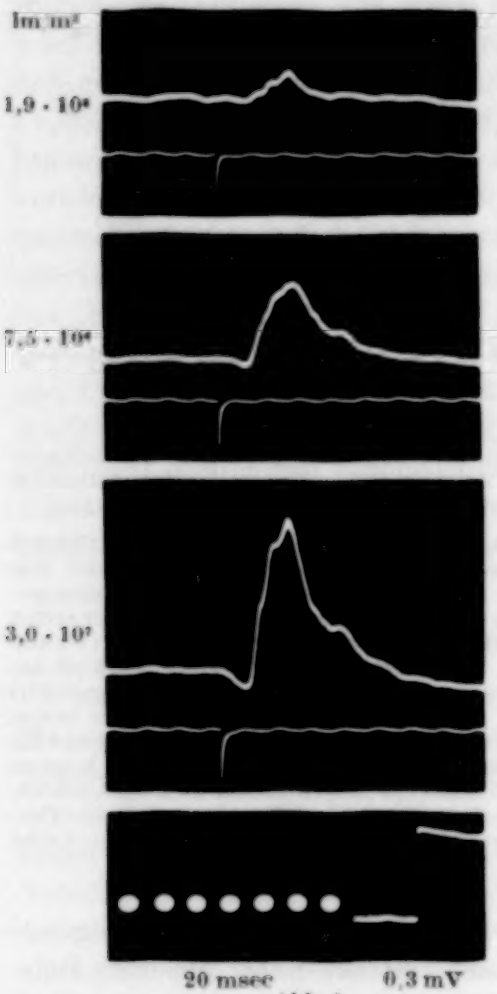

Abb. 1

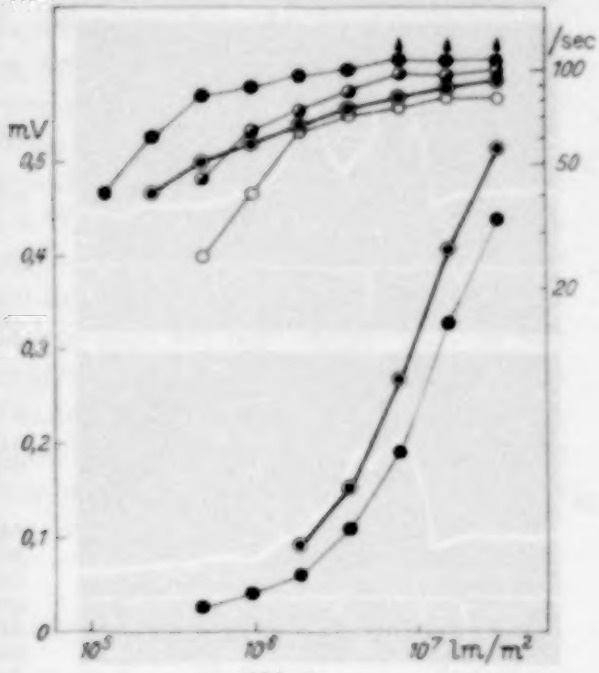

Abb. 2

Abb. 1. Einzelblitz-ERG des Alpenmurmeltieres (*Marmota marmota*) bei 3 verschiedenen Reizintensitäten (Blitzdauer etwa 10 μsec)

Abb. 2. Fusionsfrequenz des Flimmer-ERG (Blitze je sec, obere Kurvenschar) und Amplitude des Einzel-ERG (mV, untere Kurvenschar) in Abhängigkeit von der Reizintensität. Murmeltier (◉) und 3 Ziesel (●◐○)

Antwort zeichnet sich durch raschen zeitlichen Verlauf aus. Mit der höchsten verwendeten Intensität beträgt die a-Wellen-Latenz 2—3 msec, die Gipfelzeit der b-Welle 40 msec. Bei eben überschwelligen Intensitäten (1,2 log E unter der höchsten Intensität) ist die Gipfelzeit nur

um etwa 10% verlängert, so daß sie praktisch intensitätsunabhängig erscheint. Die b-Welle ist dabei stets von deutlichen Oszillationen überlagert, welche eine Frequenz von 100—125/sec aufweisen. Wird die Amplitude der Antwort als Funktion der log Reizintensität aufgetragen

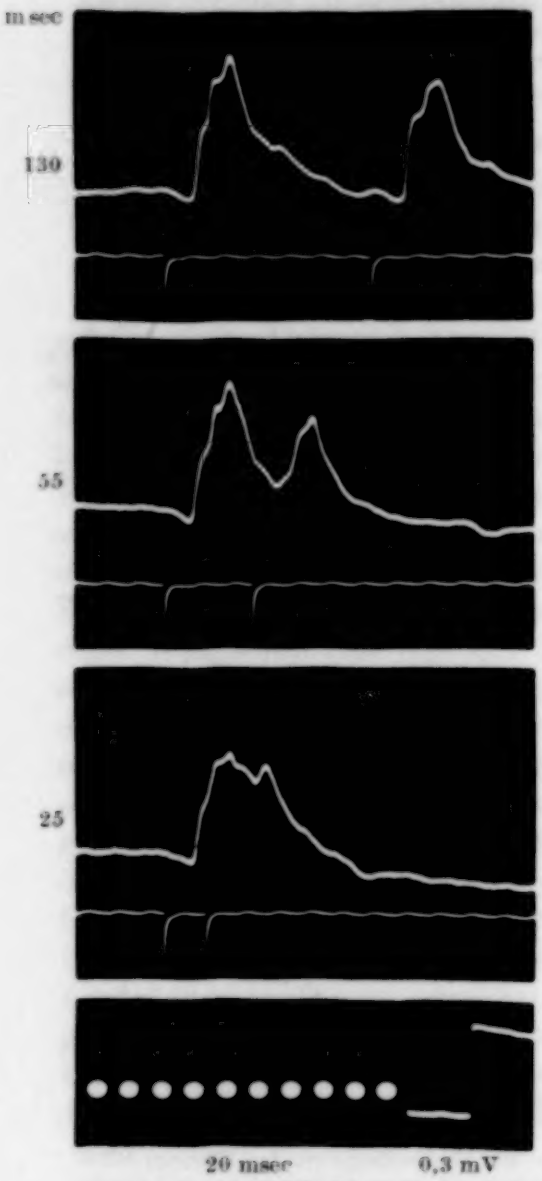

Abb. 3

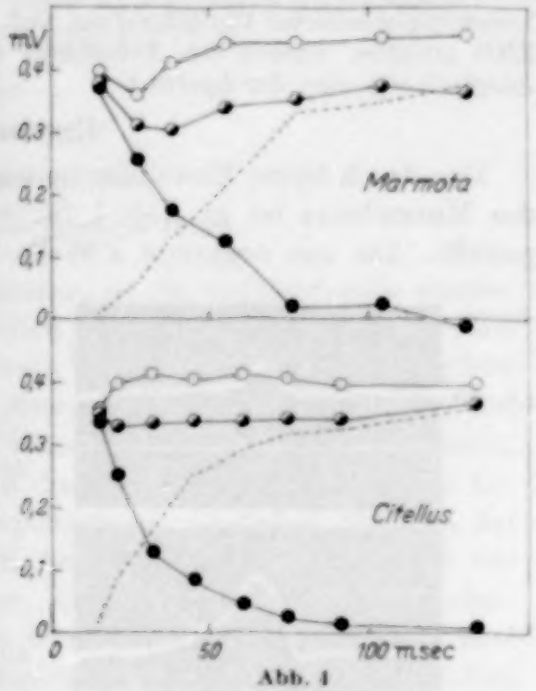

Abb. 4

Abb. 3. Doppelblitz-ERG des Murmeltieres bei 3 verschiedenen Reizintervallen (Intensität 3×10^7 lm/m², Blitzdauer etwa 10 μsec)

Abb. 4. Amplituden des Doppelblitz-ERG von Murmeltier und Ziesel in Abhängigkeit von der Länge des Reizintervalls. Die ausgezogenen Kurven stellen die Amplituden der ersten Antwort (○) sowie die Gipfelhöhen (◑) und die Fußpunkte (●) der zweiten Antwort dar (bezogen auf den durch den negativen Gipfel der a-Welle gegebenen Fußpunkt der ersten Antwort). Die strichlierte Kurve entspricht der Differenz der beiden letztgenannten Kurven und damit der Amplitude der zweiten Antwort. Bei dem Ziesel handelt es sich um jenes Tier, dessen Werte in Abb. 2 mit ● bezeichnet sind

(Abb. 2, unten), so ergibt sich eine bei relativ hohen Intensitäten liegende Kurve von auffallender Steilheit, die sich mit der unter gleichen Reizbedingungen gemessenen Intensitätsfunktion einer Zieselnetzhaut (*Citellus citellus* L., Bornschein und Szegvári 1958) nahezu deckt. Die ebenfalls in Abhängigkeit von der log Reizintensität dargestellten Verschmelzungsfrequenzen für Flimmerlichtreize liegen innerhalb der von Bornschein und Szegvári (1958) bei 3 Zieseln bestimmten Kurven-

scharen (Abb. 2, oben). Die Kurve der Verschmelzungsfrequenzen repräsentiert sich dabei als stetige Funktion, wobei eben überschwellige Antworten eine Verschmelzungsfrequenz von >40/sec aufweisen und die maximale Verschmelzungsfrequenz 90/sec überschreitet. Eingehend untersucht wurden die Antworten auf Doppelreizung mit variablem Intervall (Abb. 3). Durch nachträgliche quantitative Analyse des von Bornschein und Szegvári gewonnenen und in ihrer Veröffentlichung (1958) lediglich zur Kennzeichnung der allgemeinen Verhältnisse benützten Materials konnten Vergleichswerte für das Ziesel erhalten werden. Die in Abb. 4 für beide Tierarten dargestellten Kurven zeigen, daß die mit fortschreitender Verkürzung des Reizintervalls auftretende Amplitudenverkleinerung der zweiten Antwort weniger durch ein Absinken der Gipfelhöhe als durch einen Anstieg des Fußpunktes der Antwort bedingt ist: Die zweite Antwort reitet den abfallenden Schenkel der ersten Antwort hinauf, wobei keine Summation eintritt und die Gipfelhöhe der zweiten Antwort weitgehend konstant bleibt. Bei sehr kurzen Reizintervallen kommt es zu einer geringfügigen Amplitudenverkleinerung der ersten Antwort, indem sich die positive b-Welle der ersten Antwort und die negative a-Welle der zweiten Antwort zeitlich überlagern. Wie aus Abb. 4 hervorgeht, ergaben die Doppelreizversuche bei *Marmota* und *Citellus* ein ähnliches Verhalten, insbesonders bei Berücksichtigung der Tatsache, daß es sich bei dem Ziesel um ein nur oberflächlich narkotisiertes Exemplar mit besonders hohem zeitlichem Auflösungsvermögen (vgl. Abb. 2) handelte. Orientierende Reizversuche mit nicht definierten Dauerlichtreizen zeigten schließlich noch, daß das ERG des Alpenmurmeltiers ähnlich wie das Ziesel-ERG (Bornschein 1954) einen ausgeprägten positiven off-Effekt enthält.

Diskussion

Nach übereinstimmenden histologischen Befunden von Rochon-Duvigneaud (1930) und Kolmer (1936) besitzt die Netzhaut des Alpenmurmeltiers ausschließlich Zapfen als Rezeptoren. Von dem in der vorliegenden Studie elektrophysiologisch untersuchten Tier konnten keine einwandfreien histologischen Präparate gewonnen werden, da eine Vitalfixation aus äußeren Gründen nicht durchführbar war. Es wurde lediglich festgestellt, daß das Breitenverhältnis der beiden Körnerschichten und der Ganglienzellschicht ähnlich ist wie beim Ziesel (*Citellus citellus* L.). Hinsichtlich der histologischen Struktur der Zieselnetzhaut besteht numehr völlige Übereinstimmung, indem zwar von Kolmer (1936) eine Beteiligung von Stäbchen noch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte, aber alle neueren Untersuchungen (Walls 1942, Karli 1951, Vilter 1954, Arden und Tansley 1955) ergeben

haben, daß es sich um eine reine Zapfennetzhaut mit mächtiger Ausbildung der neuralen Schichten handelt. Das ERG des Ziesels ist durch auffallend hohe Schwelle, hohe Verschmelzungsfrequenz und geringe Adaptationsfähigkeit charakterisiert (Bornschein 1954, Arden und Tansley 1955, Tansley 1957, Bornschein und Szegvári 1958). Die Besonderheit des Ziesel-ERG kommt vor allem zum Ausdruck, wenn das stark abweichende Verhalten einer vom Stäbchensystem beherrschten Netzhaut (Meerschweinchen) zum Vergleich herangezogen wird (Bornschein und Szegvári 1958). Hingegen ergab sich in der vorliegenden Untersuchung eine Übereinstimmung zwischen den ERG von Alpenmurmeltier *(Marmota marmota)* und europäischem Ziesel *(Citellus citellus)*, die so weit geht, daß allfällige systematische Unterschiede nur durch statistische Auswertung eines größeren Materials aufgedeckt werden könnten. Da die reinen Zapfennetzhäute als einheitliches Rezeptorsystem für die Grundlagenforschung von besonderem Interesse sind, kann zu künftigen Untersuchungen das leichter verfügbare Ziesel herangezogen werden, um so mehr als die ERG-Registrierung bei dem wesentlich größeren Murmeltier keinerlei Vorteil bietet.

Die bei beiden untersuchten Gattungen beobachtete Reaktion auf Doppelblitzreizung ergab, daß sich die Antwort auf den zweiten Reiz bei Verkürzung des Reizintervalls (unter 70 msec) zwar fortschreitend verkleinert, ohne daß aber die Höhe ihres Gipfels in bezug auf die Basislinie wesentlich abnimmt. Diese Art der Überlagerung beider Antworten läßt sich einerseits mit dem schon bekannten weitgehenden Fehlen von Adaptationserscheinungen und andererseits mit einem geringen zeitlichen Summationsvermögen in Einklang bringen. So haben neuere Untersuchungen des Ziesel-ERG mit Variation der Anstiegssteilheit von Dauerlichtreizen gezeigt, daß die Amplitude der b-Welle dem Differentialquotienten des Intensitätsanstiegs nach der Zeit folgt, während das Stäbchensystem unter analogen Reizbedingungen ein mehr integratives Verhalten zeigt (Bornschein 1961).

Zusammenfassung

Das Elektroretinogramm (ERG) der reinen Zapfennetzhaut von *Marmota marmota* (L.) wird unter Verwendung weißer Einzel-, Doppel- und Flimmerlichtblitze registriert. Das aus a-Welle, b-Welle und überlagerten Oszillationen von 100—125/sec bestehende Einzelblitz-ERG des Murmeltiers ähnelt in seinem raschen zeitlichen Verlauf sowie in seiner Abhängigkeit von der Reizintensität dem schon früher untersuchten ERG des Ziesels (*Citellus citellus* L.). Dies gilt auch für die mit verschiedenen Reizintensitäten bestimmten ERG-Flimmerverschmelzungsfrequenzen sowie für die Antworten auf intensive Doppellichtblitze mit variablem Intervall. Die weitgehende Übereinstimmung der ERG von

Marmota und *Citellus* ist vor allem deshalb von Interesse, weil für künftige Untersuchungen bei reinen Zapfennetzhäuten das kleinere und leichter zur Verfügung stehende Ziesel eher in Frage kommt als das Murmeltier.

Literatur

Arden, G. B., and K. Tansley: The spectral sensitivity of the pure-cone retina of the souslik (Citellus citellus). J. Physiol. (Lond.) **130**, 225—232 (1955).

Bornschein, H.: Elektrophysiologischer Nachweis einer I-Retina bei einem Säuger (Citellus citellus L.). Naturwissenschaften **41**, 435 (1954).

— Der Einfluß der Reizanstiegszeit auf die Belichtungsantwort der reinen Zapfennetzhaut. Pflügers Arch. ges. Physiol. (1961, im Druck).

— u. Gy. Szegvári: Flimmerelektroretinographische Studie bei einem Säuger mit reiner Zapfennetzhaut (Citellus citellus L.). Z. Biol. **110**, 285—290 (1958).

—, u. K. Tansley: Elektroretinogramm und Netzhautstruktur der Sumpfohreule (Asio flammeus). Experientia (Basel) (1961, im Druck).

Karli, P.: Sur la structure de la rétine du spermophile (Citellus citellus L.). C. R. Soc. Biol. (Paris) **145**, 1376—1378 (1951).

Kolmer, W.: Die Netzhaut. In W. v. Möllendorff's Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. 3/2, S. 295—467. 1938.

Rochon-Duvigneaud, A.: Auge von Marmotta. Verh. 13. Internat. Kongr. Ophthalm. 1930, Bd. 1, S. 319.

Vilter, V.: Histologie et activité de la rétine d'un mammifère strictement diurne, le Spermophile-Citellus citellus. C. R. Soc. Biol. (Paris) **148**, 1768–1771 (1954).

— Cytoarchitectonique neuronique de la rétine d'un mammifère strictement diurne, le Citellus citellus. C. R. Soc. Biol. (Paris) **148**, 1963—1966 (1954).

Walls, G. L.: The vertebrate eye and its adaptive radiation. Cranbrook Inst. of Science, Bloomfield Hills, Michigan. 1942.

Prof. Dr. H. Bornschein, Physiologisches Institut der Universität, Wien IX (Österreich), Schwarzspanierstr. 17

Zeitschrift für vergleichende Physiologie 44, 268—291 (1961)

From the Department of Anatomy, University College London, W.C.1

THE DISCRIMINATION OF POLARIZED LIGHT BY *OCTOPUS*: A BEHAVIOURAL AND MORPHOLOGICAL STUDY

By

M. F. Moody and J. R. Parriss

With 14 Figures in the Text

(Received October 15, 1960)

Contents

Page

A. Introduction 268
B. Training experiment 270
I. Method 270
II. Training procedure 270
III. Results 271
IV. Reflection and scattering patterns 273
C. Morphology 275
I. Structure of the receptor layer of the octopus retina 275
II. The dichroism theory for the analysis of polarized light 280
D. Discussion 283
I. The behavioural responses and the dichroism theory of polarized light analysis 283
II. Significance of the horizontal-vertical arrangement of the retinal elements 284
Summary 286
Appendix I. Detailed analysis of characteristic directions when there is more than one polarizing receptor in the retina 287
Appendix II. Derivation of the dichroic absorption factor for a rhabdomere tubule 288
Literature cited 290

A. Introduction

Since the classical work of von Frisch (1948, 1949, 1950) many animals have been found to orient themselves with respect to the plane of polarization of plane polarized light[1]. The method by which these animals find the direction of the plane of polarization presents an important problem to receptor physiology. But before making a detailed study of the anatomy and physiology of an animal's visual organs we must be sure that these organs really are analysing the plane polarized light. For polarized light readily produces reflection and scattering patterns characteristic of the direction of the plane of polarization, and these

[1] These experiments have been comprehensively reviewed by Stockhammer (1959).

patterns might enable an animal to determine this direction even if its visual organs give no special responses to polarized light. Indeed, certain optomotor reactions to plane polarized light have recently been shown to disappear when the experimental situation is redesigned so that the scattering and reflection patterns cannot arise. Reviewing these and other experiments, KALMUS (1959) concludes that nevertheless many reactions to polarized light probably do depend on specialized visual receptors.

Two lines of work contribute to further understanding of this problem: experiments showing specific reactions to polarized light that eliminate as far as possible scattering and reflection patterns on which the reaction can be based[1]; and, secondly, studies of the animal's sense organs showing to what extent they possess physiological and anatomical specialization that would explain the reactions to polarized light.

This paper presents contributions to both these lines. First, it describes responses of *Octopus* to polarized light in a training situation in which the possibilities of reflection and scattering patterns arising are minimized. Second, it presents a full discussion of a possible mechanism by which the *Octopus* retina might analyse the plane of polarization and contributes new electron microscopical findings to this discussion. Finally, an attempt is made to correlate the two lines, and the deductions from the training experiments are compared with the requirements of the theoretical analysing mechanism.

The most plausible theory of how a photoreceptor might analyse polarized light postulates an orientation of the visual pigment molecules, which causes them to absorb light more strongly when the plane of polarization is in one direction than when it is at right angles to this direction (dichroism) (STOCKHAMMER 1959). But in the absence of conclusive evidence for this dichroism the theory remains unproved. However, suggestive support for it is provided by electron microscopical observations of the structure of arthropod ommatidia (GOLDSMITH and PHILPOTT 1957, FERNÁNDEZ-MORÁN 1958). The photoreceptor regions of these ommatidia consist of parallel, close-packed fine tubules whose orientation provides a possible morphological basis for the supposed orientation of the visual pigment. The considerations of the second section of this paper lend support to this dichroism theory of polarized light analysis.

A preliminary report of the training experiments has already been published (MOODY and PARRISS 1960).

---

[1] See for example the recent studies by v. FRISCH, LINDAUER and DAUMER (1960) and by WATERMAN (1960).

B. Training experiment

I. Method

Octopuses of about 200 g. were used for the experiment. The method of training was adapted from techniques originated by Boycott and Young for shape discrimination in *Octopus* (1950). The apparatus for transmitting the plane polarized light consisted of a water-tight torch fixed at the end of a 50 cm brass rod (Fig. 1). A weak light was passed through a small circular sheet of polaroid film (diameter 2.1 cm) in the front of the torch and this front could be rotated to give different directions of the electric vector. A small indicator at the side of the torch (Fig. 1) marked the position to which the polaroid had been rotated. Each vector was obtainable in two positions, the one at 180° to the other.

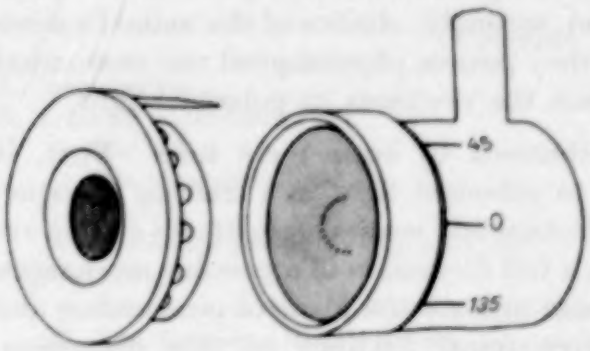

Fig. 1. Diagram of the torch used in the training experiments. The light is produced by a water-tight electric torch (right) with a rotatable front (left) containing a disc of polaroid. The direction of the electric vector is adjusted by moving the pointer of the rotatable front to the appropriate mark on the torch. There is always a choice of two equivalent positions of the pointer for any required direction of the electric vector

Each animal lived in an asbestos tank approximately 80 × 140 cm with a home of bricks at the far end. The lid was opened at the end away from the home to the extent of about 50 cm to allow the experimenter to insert the torch into the water. When the torch was within about 5 cm of the floor of the tank it was moved slowly up and down in a central position until the octopus attacked, or up to a maximum of 15 sec after which a "no-attack" was scored. If the animal attacked by way of the side of the tank the torch was always turned to face the attacking eye. When the chosen direction of the electric vector was positive the animal was rewarded for attack by being fed with a piece of sardine on the end of a wire: when negative it was given a shock of four volts by electrodes at the end of a probe.

II. Training procedure

Four groups of animals were trained, each with a different direction of the electric vector positive. Two groups (A and B) were trained to discriminate between horizontal and vertical directions of the electric vector and two groups (C and D) between oblique directions at 45° and 135° from the horizontal (see Table 1). There were originally four animals in each of the horizontal and vertical groups and two in each of the oblique trained groups, but one animal in group C became ill early in the experiment and was not scored. Sixteen animals were first pre-trained for three days, with eight trials per day, to attack whichever vector was to be the positive for the group to which they belonged. The twelve animals chosen for the final experiment were those that showed most readiness to attack and accept food. As soon as negative trials were introduced the animals were trained for

10 trials morning and afternoon (i.e. five positive and five negative at each session) with approximately 15 minute intervals between trials.

For the first three sessions the trials were given in alternating order, i.e. $+-+-+-+-+-$; this was done in order to introduce the negative trials equally in the early stages. After the third session, and for the rest of the training, the trials were arranged in the following way:

$$+--+-++-+$$
$$-++-+--+-+$$

The position of the indicator was randomly interchanged throughout the trials and a fresh piece of polaroid inserted on Day 7 when, for one session, trials were given without reward or shock.

In this way the animals could not learn the discrimination from clues such as the pattern of trials, position of the indicator or scratches on the polaroid, and the "no reward" tests served as an additional control. During the last 20 trials tests with both unpolarized light and no light at all were inserted without reward or shock between the normal training trials as follows:

$$0+-0-+0-+0+-0+-0$$
$$0-+0+-0+-0-+0-+0.$$

Tests with unpolarized light were given for three sessions and tests with no light for two. For the tests with unpolarized light the polaroid was removed from the torch, clear glass inserted and the lamp voltage adjusted until the torch appeared to have the same brightness as before. For "no light" a sheet of black card was inserted over the polaroid and the torch lit normally. These tests checked the possibility that the animals might be discriminating between two different intensities of light rather than actually discriminating between different vectors of plane polarized light (see page 283).

III. Results

1. Each group of animals showed significant learning of the discrimination tested; using a two cell table of χ^2 for equal expected frequencies, $p < .01$ in each case. The % correct responses were as follows: Group A, vertical vector positive, horizontal vector negative, 79%; Group B, horizontal vector positive, vertical negative, 75%; Group C (only one animal) oblique 45° vector positive, 135° negative, 71%; Group D, oblique 135° vector positive, 45° negative, 65%. (Table 1.)

Table 1. *Group scores*

	No. of Animals	Directions of the e-vector		Correct Responses / Total Trials				Unrewarded tests	
		Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Total	%	Total attacks White	Total trials Black
Group A	4	↕	↔	285/360	286/360	571/720	79	39/72	20/48
Group B	4	↔	↕	243/365	308/365	551/730	75	29/72	13/48
Group C	1	↙↗	↘↖	75/100	67/100	142/200	71	5/18	2/12
Group D	2	↙↗	↘↖	115/200	147/200	261/400	65	10/36	3/24

2. Counting the total number of correct responses for Groups A + B, trained on horizontal and vertical, and Groups C + D, trained on the obliques, Groups C + D learnt significantly worse than Groups A + B. ($p < .01$: 2×2 contingency table for χ^2.)

3. a) In Groups A and B considered alone, A made significantly more attacks on the positive than B ($p < .01$: $\chi^2 = 14.5$) but only slightly more attacks on the negative ($.10 > p > .05$: $\chi^2 = 2.95$, not significant).

b) In Groups C and D considered alone, C made significantly more attacks than D on the positive ($p < .02$: $\chi^2 = 5.6$) but an almost identical proportion on the negative.

The curious drop in the number of attacks on the positive made by Group B after 40 trials is hard to explain (Fig. 2). Possibly the discrimination with the horizontal vector positive is slightly the more difficult to maintain. [Similar preferences have been demonstrated in both *Octopus* and *Sepia* with shape discrimination (Sutherland and Muntz 1959, Wells 1958)]. The same factor applies to Groups C and D; there may possibly be a preference for the 45° oblique. However, both these differences could equally be due to sampling errors. Looking at the individual scores shown in Table 2 it can be seen that in Groups B and D (Bb, Bc; Db) there are more animals making a low score than in Groups A + C (Ab only). It is interesting to note that this tendency not to attack is still prevalent in two animals during the session with unrewarded tests on black and no light (Ab, Bc).

Table 2. *Scores of individual animals*

	No. of Animals	Directions of the e-vector		Correct Responses / Total Trials				Unrewarded tests	
		Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Total	%	Total attacks White	Total trials Black
Group A	a			93/100	74/100	167/200	83	15/18	10/12
	b	↕	↔	48/100	89/100	137/200	68	4/18	1/12
	c			96/100	71/100	167/200	83	11/18	6/12
	d			48/60	54/60	102/120	85	9/18	3/12
Group B	a			77/100	84/100	161/200	80	7/18	4/12
	b			57/100	74/100	131/200	65	9/18	5/12
	c	↔	↕	19/65	55/65	74/130	57	3/18	0/12
	d			90/100	95/100	185/200	92	10/18	4/12
Group C	a	↗	↘	75/100	67/100	142/200	71	5/18	2/12
Group D	a	↘	↗	65/100	77/100	142/200	71	2/18	0/12
	b			50/100	69/100	79/200	38	8/18	3/12

5. There was no statistical difference for the number of attacks made on tests with either unpolarized light or "no light" between the groups discriminating the same pair of vectors, i.e. between A and B and between C and D (Table 1). (The highest χ^2 was 2.2 which is not significant.) Thus neither unpolarized light nor "no light" was significantly associated with any one of the four vectors used.

6. The mean number of attacks per trial are plotted in the form of a learning curve for each group of animals (Fig. 2). Every point represents a mean for five positive and five negative trials. In Groups A and B it can be seen that the curves separate almost immediately and stay well apart indicating an easy discrimination, whereas the curves for C and D show a much more erratic pattern, crossing several times, before finally separating.

7. The level of discrimination was clearly maintained in each group throughout the set of "no reward" tests given on day 7 (trials 65—70). This factor eliminates the possibility that the animals were responding to clues associated with the giving of food or shocks, and indicates that the responses were sufficiently strong for unlearned stimuli (i.e. unpolarized light and "no light") to be interposed between trials without seriously affecting the level of the discrimination reached.

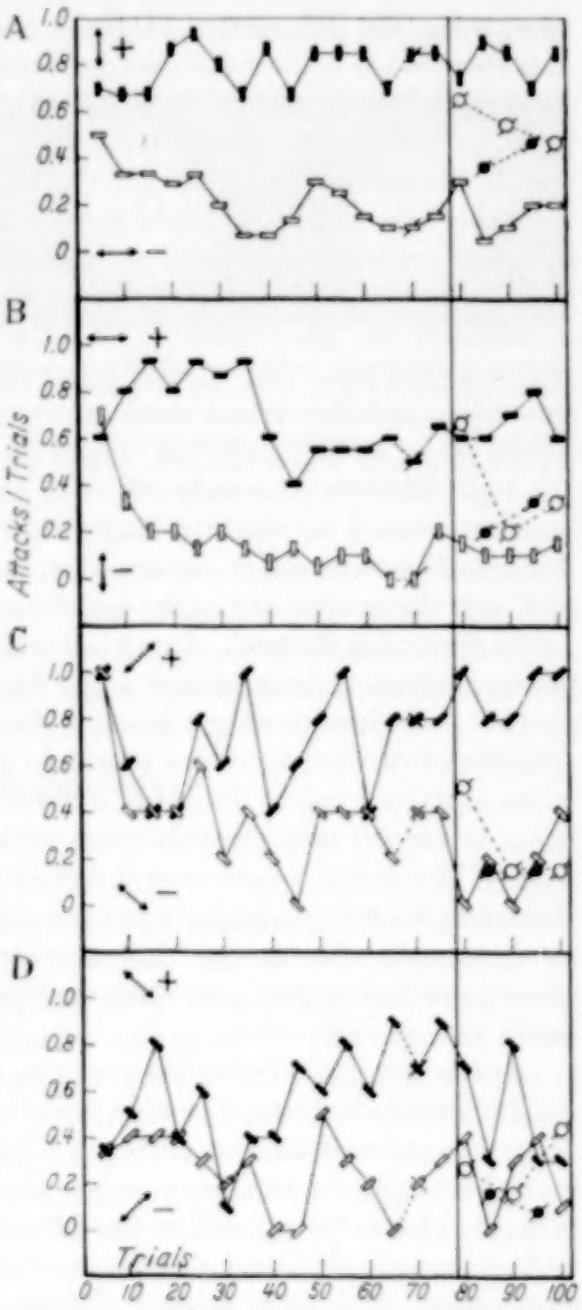

Fig. 2. Graph showing mean number of attacks per trial for each of the four groups of animals A, B, C and D, discriminating between different positions of the electric vector of plane polarized light. Open shapes indicate proportions of attacks at the vector for which attacks were discouraged by shocking the animal; closed shapes indicate proportions of attacks at the vector for which attacks were rewarded. The angles of the vectors being discriminated are represented by the orientation of the open and closed shapes; 0°, 90°, 45° and 135° respectively. The oblique line through the shapes at 70 trials indicates that these attacks were neither rewarded nor shocked. ○ and ● indicate mean attacks for unrewarded trials with *unpolarized light* and *no light* respectively

IV. Reflection and scattering patterns

Before we can speculate about how the receptor cells of the retina might be able to discriminate different directions of the electric vector, we have to examine critically the possibility that the discrimination is based on extra-ocular reflection or scattering patterns.

a) Reflection Patterns. When light strikes a medium of higher refractive index it is partially reflected, and plane polarized light is more strongly reflected when its electric vector is perpendicular to the plane of incidence than when it is parallel. The octopus would occasionally see the walls and floor of the tank illuminated by the torch, and, by comparing the intensities of these (very weak) reflections, it is conceivable that it could have discriminated ↕ from ↔. But ↙ and ↘ would give equal intensities of reflection at the vertical walls or horizontal floor, so the octopus cannot have used reflection patterns from the tank for its discrimination of ↙ and ↘.

Otherwise reflection could have occured only *on the animal's body.* However, octopuses usually sit tucked in behind the bricks that form their home until the decision is made to attack. Only when this decision is difficult do they stretch an arm tentatively towards the object before attacking. The normal behaviour is to swim head first towards the object and then immediately encompass it with the arms. Reflection would occur *at the lens of the octopus's eye*, but, when the eye is viewing the light directly, the only effect of polarized light would be that the aperture would be slightly larger in the plane of the electric vector. Exactly the same effect occurs when polarized light falls on the human eye, but its results are quite undetectable by us.

b) Scattering Patterns. Small isotropic particles scatter plane polarized light in all directions except along the exact direction of the electric vector. So, when viewing a beam of plane polarized light at right angles, rotation of its electric vector produces a great difference in the intensity of its scattered light. But this difference progressively vanishes as the beam is viewed in a direction that more nearly approaches that of the beam. The torch beam was insufficiently broad and bright to show scattering to our eyes when it was examined in sea water. But, even if the octopus were able to see the extremely faint scattering that would theoretically be present, we shall see that it is unlikely that it could have made use of these clues.

As the torch was being lowered into the water, the octopus had for a brief interval the chance of viewing the beam at *right angles*, before the beam was pointed directly at it (page 210). The intensity of light scattered at right angles to the beam when the beam is in different positions (directly above the animal, to the left, etc.) provides enough information to discriminate different directions of the electric vector. But the discrimination of ↕ from ↔ and ↙ from ↘, as well as all four directions from unpolarized light, would require regular side views of the beam through an arc of at least 90°. It is very unlikely that the movements of the torch would have allowed such regular side views, and the animal's attention was always concentrated on the torch, with at least one eye looking straight at it.

When the torch was viewed *directly*, some such faint scattering patterns as shown in Fig. 3 might be theoretically expected. Such patterns were invisible to us in a darkened room, and should be still more so to the octopus, which would see them against the illuminated front of the asbestos tank. Moreover, the only difference for ↗ and ↘ would be the different oblique orientations of the oval-shaped scattered light (Fig. 3). But the octopus is virtually incapable of discriminating the different oblique orientations of white rectangles (size 10 × 2 cm) (SUTHERLAND 1957, 1958) and so could not have based its discrimination of ↗ and ↘ on these supposed scattering effects.

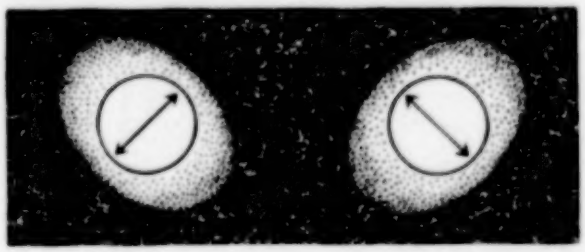

Fig. 3. Scattering patterns which might be seen when looking at the torch (Fig. 1) through turbid water. The arrows show the directions of the electric vector. The scattering patterns of ↗ and ↘ differ only in the different oblique orientations of the oval-shaped scattered light

While we cannot rigorously exclude the possibility of extraocular discrimination (analysis), the above reasons show that it is remote (at least in the case of ↗ and ↘). Serious consideration must therefore be given to the possible mechanisms of intra-ocular analysis. The lens and aqueous humour appear to be quite transparent, so attention will be focussed on the structure of the retina.

C. Morphology

1. Structure of the receptor layer of the octopus retina

Many investigators, e.g. SCHULTZE (1869) and GRENACHER (1883), have shown that the receptor layer of the octopus retina differs considerably from that of the vertebrate retina. Instead of rods and cones, it consists of pigment-containing retinula cells, separated from each other by refractile prisms called rhabdomes (Fig. 4a); it therefore shows a certain similarity to the receptor region of the compound eyes of arthropods. Electron microscopy has recently shown that the rhabdomes have a similar structure in the two groups. The rhabdomes of arthropods consist of fine tubules, 500—1000 Å diameter, close-packed in hexagonal array, with their long axes generally perpendicular to the direction of the light (MILLER 1957, GOLDSMITH and PHILPOTT 1957, FERNÁNDEZ-MORÁN 1958). The octopus rhabdomes consist of tubules, apparently identical with those of the insects, and approximately 600 Å diameter (WOLKEN 1958; Figs. 5 and 6). Each close-packed group of parallel tubules is termed a rhabdomere (Figs. 4b, 5 and 6).

There are good reasons for believing that the walls of the rhabdomere tubules are composed of lipoprotein membranes (see page 281), and

constitute the only extensive quantity of lipoprotein membrane in the receptor layer of the retina. The similarity between octopus rhodopsin and most vertebrate rhodopsins (Brown and Brown 1958; Kropf, Brown and Hubbard 1959) suggests that octopus rhodopsin is involved in lipoprotein membranes, and it is therefore probably localised in the rhabdomeres, which can be regarded as the primary photoreceptor regions of the retina.

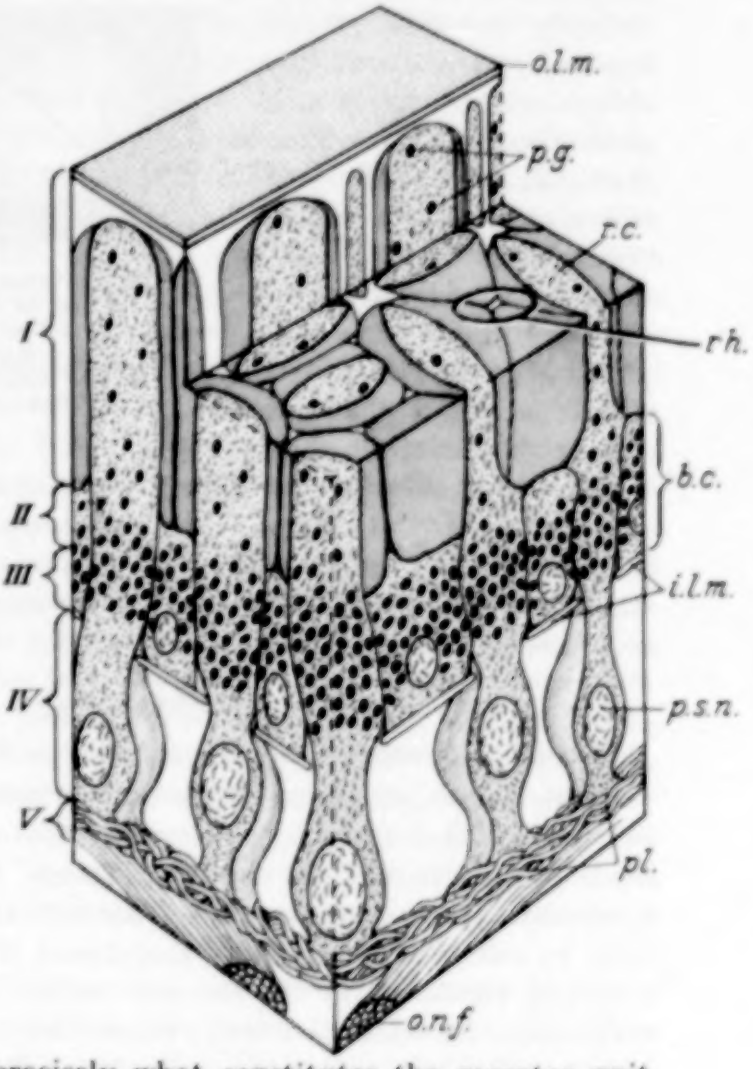

Fig. 4a. Somewhat diagrammatic picture of the octopus retina seen at the level of resolution of the light microscope, showing the appearance of both radial and tangential sections. The physiological direction of the light is from above. At least five layers can be distinguished: *I* Receptor layer, containing rhabdomes and retinula cells. *II* Basal pigment layer, which provides a dark "backing" to the receptor layer. *III* Layer of basal cell nuclei. *IV* Layer of proximal segments. *V* Plexiform layer. *b.c.* basal cell; *i.l.m.* inner limiting membrane; *p.s.n.* proximal segment nucleus; *p.g.* pigment granule; *pl.* plexus; *o.l.m.* outer limiting membrane; *o.n.f.* optic nerve fibres; *r.c.* retinula cell; *rh.* rhabdome. Thin lines divide the approximately square rhabdomes into their constituent rhabdomeres. [Based mainly on Young (1961) and unpublished observations]

It is not yet known precisely what constitutes the receptor unit, corresponding to a rod in the vertebrate retina. The retinula cells are continuous with the proximal segments (Fig. 4a), and the central processes of these constitute the optic nerve fibres (Schultze 1869, Grenacher 1883, Young 1961). In the receptor layer, each retinula cell is usually in contact with two rhabdomeres (Figs. 4b, 5 and 6); and so it would be expected that counts made on serial tangential sections of the retina would show twice as many rhabdomeres in the receptor layer as proximal rod segment nuclei in the region central to the limiting membrane. This has been found to be so (Young 1961). Thus the simplest

interpretation of the light microscope evidence is that the receptor unit constitutes the inner proximal segment, whose outer process is the retinula cell of the receptor layer; and that each retinula cell responds to the intensity of light absorbed by its two surrounding rhabdomeres (Fig. 9).

Such an interpretation receives only partial confirmation from electron microscopy. In its favour there is evidence confirming the continuity of the retinula cell with the proximal segment as shown in

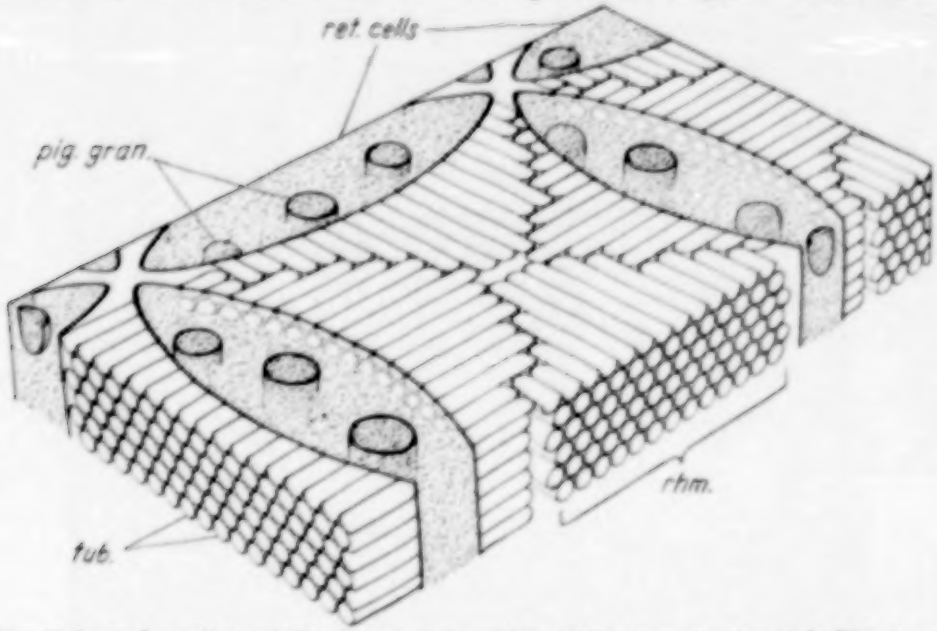

Fig. 4b. Enlarged portion of the tangential section of the receptor layer in Fig. 4a. The central square rhabdome is composed of four rhabdomeres (*rhm.*), each consisting of a close-packed group of parallel tubules (*tub.*). Two rhabdomeres of the central rhabdome have the tubule axes pointing in one direction, and the remaining two have the tubule axes pointing in the direction at right angles to this. This arrangement is an oversimplification (as can be seen from Figs. 5 and 6), but its significance is discussed on page 284. *Pig.gran.* pigment granules; *ret.cells* retinula cells. [First published by Nature, **186**, 839 (1960).]

Fig. 4a. Furthermore, the tubules of any given rhabdomere adhere to (usually just one) retinula cell in a way that seems to suggest that they have grown out of it (Figs. 5, 6 and 7). This is in accord with the structure of the analogous rhabdomeres of *Drosophila* compound eyes, in which the rhabdomere tubules develop as microvillar processes of the retinula cells (Waddington and Perry 1959). But in the adult octopus retina the relation of the tubules to the retinula cells is not clear. In both $KMnO_4$ - and OsO_4 - fixed preparations the lumen of the rhabdomere tubules shows no clear continuity with the cytoplasmic matrix of the neighbouring retinula cells. Sometimes the lumen of a tubule is separated from the cytoplasmic matrix of the adjacent retinula cell by a compound membrane (*c.m.* in Fig. 7) formed from the surface membrane of the tubule and that of the retinula cell. Unless such a tubule has some other point of continuity with a cell (possibly via another tubule) this would imply that some of the tubules are extracellular — a remarkable possibility about which decisive evidence has so far not been obtained.

In the compound eye of *Limulus*, the sensory information is collected by the dendritic distal process of a distinct eccentric cell (Miller 1957). It should be noted that the centre of each octopus rhabdome almost always contains fine tubular cyto-

Fig. 5. Portion of a tangential section of the photoreceptor layer of *Octopus* retina, showing a relatively regular arrangement of the retinula cells (*r.c.*). Between the retinula cells lie the rhabdomes composed of fine tubules packed in parallel groups or rhabdomeres (*rhm.*). Each double-headed arrow indicates the direction of the long axes of the nearby tubules. The arrows in any retinula cell lie approximately parallel, suggesting that the cell might act as a dichroic analyser of plane polarized light (see p. 283). *p.g.* pigment granule. (All the electron micrographs are of material fixed in OsO_4 and embedded in Araldite)

plasmic processes running *parallel* to the long axes of the retinula cells (Fig. 8). These fine processes are the only cytoplasmic structures, apart from the retinula cells, that are continuous from the receptor layer into the basal pigment layer; and

Fig. 6

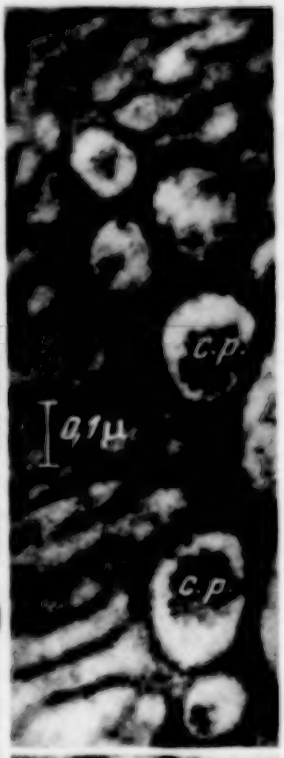

Fig. 8

Fig. 7

Fig. 6. Portion of a tangential section of the photoreceptor layer of an *Octopus* retina (different from that in Fig. 5) in which the retinula cells (*r.c.*) are not very regularly arranged. However, the double-headed arrows in any retinula cell are nevertheless approximately parallel

Fig. 7. (Bottom right.) The boundary region between a retinula cell (*r.c.*) and a rhabdomere. Between the lumen of a tubule (*tu.*) and the cytoplasmic matrix of a neighbouring retinula cell (*r.c.*) lies a triple-layered compound membrane (*c.m.*); a similar compound membrane separates the lumens of two neighbouring tubules

Fig. 8. (Top right.) Part of the central region of a square rhabdome, where several rhabdomeres meet. Embedded in a dark granular matrix lie several fine cytoplasmic processes (*c.p.*)

they are processes of the basal cells (Fig. 4a) that lie between the rhabdomes and the inner limiting membrane (unpublished observations).

Despite the difficulties, there is no evidence that would directly contradict the simple interpretation shown in Fig. 9. At all events, since the rhabdomeres are almost certainly the site of the primary photoreception, any intraocular mechanism for discriminating polarized light must ultimately depend on different light absorption by individual rhabdomeres.

Fig. 9. Receptor unit of the octopus retina, based on the simplest interpretation of the histological evidence. The light is received by two rhabdomeres (*rhm.*) and the signal transmitted by the retinula cel (*r.c.*) to the main cell body or proximal segment (*p.s.*) whose central process is an optic nerve fibre (*o.n.f.*). *p.g.* pigment granules, which are usually absent below the level of the inner limiting membrane (shown by the dotted line). Compare with Fig. 4a

II. The dichroism theory for the analysis of polarized light

We can now discuss how the structure of the receptor layer might provide a mechanism for determining the direction of the electric vector of plane polarized light. The remarkable structural similarity between the receptor layer of the octopus retina and that of the insect ommatidium suggests that the mechanism for polarized light discrimination might be the same in both cases.

Stockhammer (1956, 1959) suggested that insects might be sensitive to the direction of the electric vector because they possess dichroically absorbing photoreceptors; he was unable to find dichroism as frequently as expected (1956), but the *birefringence* of the rhabdomeres shows a radial pattern, repeated in neighbouring ommatidia. Fernández-Morán (1958) found a similar radial pattern in the orientation of the rhabdomere tubules. So the structural basis for a dichroic analyser seems to exist in arthropods, even if the expected dichroic absorption has not been demonstrated in the rhabdomeres (de Vries and Kuiper 1958). It is possible that the dichroism was too weak, or occured at the wrong wavelengths to be detected, so the question of its existence is not yet decided.

There appears to be no published study of dichroism in the octopus retina, and such a study would be difficult because of the pigment granules, both in the receptor layer and in the basal pigment layer. But we shall now present some theoretical arguments for expecting that rhabdomeres would show a significant dichroism, which might be very

weak except at low light intensities, even though it would be of physiological importance at all light intensities.

These arguments are based on a structural similarity between rhabdomere tubules and the lamellae ("double membrane discs") of the outer segments of vertebrate rods and cones.

The latter are derivatives of the cell membrane, because they have a high phospholipid content (COLLINS, LOVE and MORTON 1951 and 1952, SJÖSTRAND and GIERER 1959); show birefringence characteristic of oriented lipid molecules in a cell membrane (SCHMIDT 1938); are fixed by $KMnO_4$ to give a structure (the "unit membrane" — ROBERTSON 1960) apparently characteristic of cell membranes and their derivatives; and, finally, they are (at least occasionally) seen to be formed by intuckings of the cell membrane of the outer segment of the rod or cone (MOODY and ROBERTSON 1960). A high lipid content of octopus rhabdomes is suggested by the procedure for extracting their rhodopsin (see BROWN and BROWN 1958), and the walls of the rhabdomere tubules show the unit membrane structure after $KMnO_4$ fixation (MOODY and ROBERTSON 1960). Further evidence that these tubule walls are derivatives of the cell membrane comes from the similarity of size and appearance between the rhabdomere tubules of octopus and those of the compound eyes of arthropods (WOLKEN 1958). Arthropod rhabdomere tubules show birefringence with the direction of e for greatest refractive index perpendicular to their long axis (STOCKHAMMER 1959). This is just as would be expected if the tubule walls have the same structure as the cell membrane, since the long axes of the lipid hydrocarbon chains would lie perpendicular to the long axis of the tubule. (The result could not be a consequence of form birefringence, which would have the opposite direction.) Finally, as mentioned on page 277, the tubules of the *Drosophila* rhabdomeres are formed during development as microvillar processes of the retinula cell, whose surface membrane therefore forms the tubule wall (WADDINGTON and PERRY 1959).

This structural similarity between octopus rhabdomere tubules and vertebrate rod lamellae, and the presence in both of rhodopsin as the visual pigment, suggests that the rhodopsin might be organised in a similar way in both these structures. The dichroism of the outer segments of frog rods shows that the rhodopsin molecules have their electric absorption vectors in the plane of the lamellar membranes, but are otherwise randomly orientated (SCHMIDT 1938, DENTON 1959). If the same principles govern the orientation of the rhodopsin molecules with respect to the plane of the membranes of the rhabdomere tubules in the octopus, then each tubule should absorb polarized light twice as strongly when the electric vector lies parallel to the tubule axis as when it is perpendicular (see Appendix II).

But the effect of light on octopus rhodopsin is to convert it into metarhodopsin, in which the carotenoid pigment is no longer 11-*cis* (neo-*b*) retinene, but all-*trans* retinene (BROWN and BROWN 1958; KROPF, BROWN and HUBBARD 1959). The effect of this photoisomerization is to rotate the molecule through approximately 45^0—90^0 (Fig. 10). If the electric absorption vector lies along the long axis of the molecule.

this rotation would reduce the strength of the dichroism, or possibly even reverse its direction. Since the absorption spectrum of octopus rhodopsin is nearly the same as that of octopus metarhodopsin (Brown and Brown 1958; Kropf, Brown and Hubbard 1959), the total dichroism of the tubule would be equal to the sum of the dichroism of the rhodopsin and that of the metarhodopsin. On exposure to light an equilibrium mixture of these two substances is produced (Brown and Brown 1958), so that the total dichroism of the tubule would be small. However, rhodopsin would still be the only pigment involved in visual perception, so that the octopus rhabdomere tubule could still be acting as a dichroic analyser of polarized light *even when no dichroism is detectable*, because of masking by metarhodopsin.

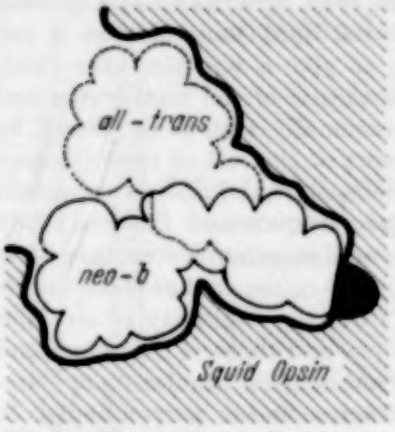

Fig. 10. Chromophoric site of squid opsin (octopus opsin would be identical in this respect) before and after photoisomerization. *Neo-b (11-cis)* retinene is converted by light into the all-*trans* isomer. The configuration of the chromophoric site is hypothetical. Reproduced from Hubbard and St. George (1958)

If the rhodopsin molecules absorb dichroically as calculated in Appendix II, the rhabdomere should itself absorb dichroically, since its constituent tubules have their axes parallel. Whatever constitutes the receptor unit of the retina (see page 277), it is unlikely that the information derived from this differential response of the rhabdomeres to different directions of the electric vector would be entirely lost in the rest of the visual pathway, so it is not unreasonable to ascribe the discrimination of plane polarized light to physiologically specialized visual receptors.

Summarizing the results of the two previous sections, it is reasonable to suppose that the receptor unit of the retina consists of the retinula cell together with its surrounding rhabdomeres (usually two); and that these form the outer process of the proximal segment, which produces (probably one) optic nerve fibre (page 277 and Fig. 9). It is also likely that each rhabdomere is a dichroic analyser of polarized light, maximum absorption occuring when the electric vector lies parallel to the axes of the rhabdomere tubules (page 281). Consequently, if the tubule axes of both rhabdomeres of a receptor unit were to be parallel, the entire receptor unit would respond differentially to polarized light; conversely, if the rhabdomeres were at right angles, the contribution of one rhabdomere would be complementary to that of the other rhabdomere, and the receptor unit as a whole would probably show little differential

response to polarized light. The retinal units approximate more closely to the former structure than to the latter (Figs. 5 and 6), so they could well be physiologically specialized to respond differentially to directions of the electric vector[1]. Such "polarizing receptors" would measure the component of the electric vector in a certain direction, the "characteristic direction" of the receptor; and this characteristic direction should coincide with the long axis of the rhabdomere tubules.

D. Discussion

I. The behavioural responses and the dichroism theory of polarized light analysis

If we are right in supposing that the characteristic direction coincides with the long axis of the rhabdomere tubules, then the orientations of these axes (as inferred from electron micrographs) should provide just those characteristic directions that are required to explain the results of the training experiments. We shall therefore examine the training results and attempt to explain them by postulating the minimum necessary number of polarizing receptors.

As the first hypothesis let us suppose that all the polarizing receptors are of one type, i.e. that they all have the same characteristic direction. In this case the octopus would discriminate the different directions of the electric vector only through differences in light intensity. Since the octopus discriminates ↕ from ↔ the characteristic direction cannot lie exactly at either 45° or 135° to the horizontal, since at either of these angles the receptors would receive equal components of the electric vector (and hence equal light intensities) from both ↕ and ↔. Similarly, because the octopus discriminates ↗ from ↖, the characteristic direction cannot lie at exactly 0° or 90°. These four directions are the only ones which can be rigorously eliminated, and the remaining directions are shown by the shaded regions in Fig. 11.

But these remaining directions can also be eliminated, though with less certainty.

As an example, consider the directions between 45° and 90°. These lie close to ↕ and ↗, and approximately at right angles to ↔ and ↖. So ↕ and ↗ would appear brighter than ↔ and ↖. Therefore *unpolarized* light (of the same brightness as the polarized light) would appear more similar to ↕ and ↗ than to ↔ and ↖. But the octopuses did not react to unpolarized light as though it were more similar to ↕ and ↗ than to ↔ and ↖; so the characteristic direction cannot lie between 45° and 90°. The same argument applies to each of the shaded regions in Fig. 10, and can be used to eliminate all of them. However this argument is not quite rigorous because it is not known what intensity of unpolarized light would exactly match (for the octopus) a given intensity of plane polarized light; and it is possible that the

[1] But even if the two rhabdomeres of a receptor unit were oriented in *random directions* to each other, they would often be sufficiently parallel for the receptor to respond differentially to directions of the electric vector.

slight mis-match in intensity (or, for that matter, the slight difference in colour) would have been always sufficient to make the octopus regard unpolarized light as quite different from ↕, ↗, ↔, ↘, and so to associate it with none of these directions of the electric vector.

Since the first hypothesis, that there is only one type (or orientation) of polarizing receptor, is largely eliminated, we can now consider the next possibility, that there are just *two* types of polarizing receptor, i.e. that the receptors can have their characteristic directions in either of two possible orientations. But since each of these orientations can lie anywhere between 0° and 180° the combination of the two produces a large number of configurations, of which only a few can be eliminated. A detailed analysis of the two-receptor hypothesis is therefore presented in Appendix I, and the conclusions summarized in Fig. 13. This shows that the experimental discriminations allow a large number of possible configurations of two or more different kinds of polarizing receptor, and only a few simple configurations are eliminated.

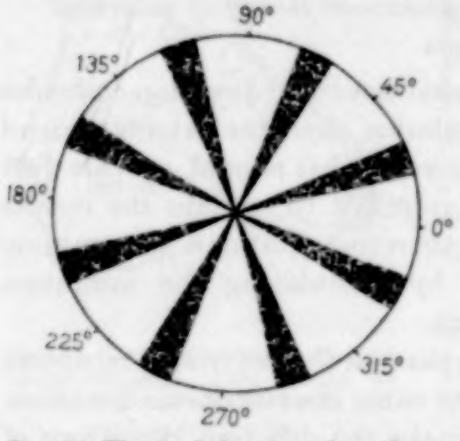

Fig. 11. The shaded sectors show those orientations of a *single* polarizing receptor which cannot be eliminated solely on the grounds that the octopus discriminates ↕ from ↔ and ↗ from ↘

Looking now at the electron microscopical evidence, we find (in tangential sections of the retina — see Figs. 5 and 6) the tubule axes oriented in not one or even two directions, but in several directions, and by no means confined to directions which form one of the few "forbidden" configurations of Fig. 13. Although the evidence from electron microscopy is thus consistent with the deductions from the training experiments, the variety of discriminations is too great to provide a critical test of the hypothesis that the characteristic direction coincides with the long axis of the rhabdomere tubules.

II. Significance of the horizontal-vertical arrangement of the retinal elements

The tubule axes are oriented in several directions but their orientation is not completely random. The flattened surfaces of the retinula cells are arranged mainly in horizontal and vertical planes (Young 1960), and the tubule axes of a rhabdomere tend to lie perpendicular to the surface of the neighbouring retinula cell. So the tubule axes are probably preferentially orientated in the horizontal and vertical directions. (Fig. 4b shows a small hypothetical region of retina where the axes are strictly confined to these directions.)

This arrangement is important when we consider not only the receptor unit itself, but also the nervous system, which must extract the information for discriminating between different directions of the electric vector. Receptor cells with different characteristic directions must form different nervous connections, and one would expect a simple analysing system based on relatively few characteristic directions. From this point of view one might regard the horizontal and vertical directions as the "significant" characteristic directions, and all other directions of the tubule axes as statistical fluctuations from horizontal or vertical. The receptors with these deviant characteristic directions would then contribute to the analysing system only in so far as their orientation approximates to the horizontal or vertical; otherwise they would only increase the noise level of the system.

However, such a system could not distinguish between receptors whose characteristic directions were at $(90 - \delta)^0$ from those at $(90 + \delta)^0$ (δ represents the angle of deviation). Consequently there would be no difference between the responses of the system to ↗ and ↖. Since the octopus discriminates ↗ from ↖ its retina cannot be quite as simple as we have been supposing; a third direction of the tubule axes must be "significant" in addition to the horizontal and vertical directions. But there is no obviously preferred third direction. Perhaps there *is* no third direction, but the horizontal-vertical array is tilted, or its axes are at an angle of less than 90^0; these distortions would allow the retina to discriminate between ↗ and ↖. Such distortions might be relatively small, since the octopus discriminates between ↗ and ↖ significantly less well than ↕ between and ↔ (page 272), though there are several other possible explanations for this result.

Alternatively, the analysing system might not be based on a relatively few discrete "significant" characteristic directions; it might be that the pattern of neural connections of a receptor is varied continuously with the angle of its characteristic direction, and there would be no need for the characteristic directions of the receptors to be concentrated in any particular direction.

Although the forgoing discussion has given us no completely clear picture of the significance of the horizontal-vertical arrangement of the retinula cells and rhabdomere tubules, nevertheless this arrangement probably has the following function. Since each receptor must have a pattern of neural connections appropriate to the orientation of its characteristic direction, this orientation must be determined fairly exactly during morphogenesis. There are two ways of determining this orientation: each retinula cell could establish its own orientation independently of all the other cells (e.g. by maximizing or minimizing its response to a certain source of polarized light); or the whole receptor layer could have

an overall pattern of organization, and each retinula cell would establish its orientation with respect to this. The square grid formed by the horizontal-vertical arrangement of the retinula cells forms just such an overall pattern of organization.

These studies have been concerned only with receptor physiology, and have not touched on the important question of the use (if any) the octopus might make of its ability to discriminate polarized light. Only one source of polarized light has been described in the ocean—sunlight scattered by microscopic particles in the water (Ivanoff and Waterman 1958). By determining the direction of the eletric vector of such scattered light, the octopus could find the direction of the sun. This information might be of even more use to more mobile cephalopods, such as the cuttlefish, whose retina is so similar to that of the octopus that it too can probably determine the direction of the electric vector of polarized light.

Summary

1. Groups of octopuses were trained to discriminate between different directions of the electric vector of plane polarized light coming from a small underwater torch.

2. Clear discrimination was shown between vertical and horizontal, and between 45° and 135° oblique directions of the electric vector.

3. The possible ways in which the animal might base its discrimination on the perception of scattering or reflection patterns in its environment are examined, and it is concluded that they do not provide a satisfactory explanation.

4. The discriminations probably involve specialised retinal photoreceptors, so some electron microscopical findings are presented concerning the structure of the receptor layer of the retina. The tubules of the two rhabdomeres on opposite sides of any one retinula cell are often approximately parallel, but those attached to different retinula cells can have quite different directions.

5. Theoretical reasons are given for supposing that the rhabdomere tubules show dichroism (though this might be difficult to observe); polarized light should be absorbed preferentially when its electric vector lies parallel to the long axis of a tubule. If the rhabdomeres do indeed show this dichroism, most of the receptor units of the octopus retina should give different responses for different directions of the electric vector of polarized light.

6. This hypothesis is shown to be consistent with both the observed discriminations and the fine structure of the receptor layer of the retina.

7. The connection between these results and the square "grid" organisation of the receptor layer of the retina is discussed.

Appendix I
Detailed analysis of characteristic directions when there is more than one polarizing receptor in the retina

Since the simplest hypothesis, that there is only one type of polarizing receptor, is largely eliminated (see page 283), we can now consider the simplest remaining possibility, that there are just *two* types of polarizing receptor, i.e. that the receptors can have their characteristic directions in either of two possible orientations.

To begin with, the angles of the two receptor types virtually coincide if they are within 10° of each other, or if one angle is near 180° when the other angle is near 0°. Next, since the octopus discriminates ↗ from ↖, one characteristic direction cannot lie at 90° when the other characteristic direction is at 0° or 180°. Similarly, because the octopus discriminates ↕ from ↔, one characteristic direction cannot lie at 45° when the other is at 135°. These are the only configurations which can be

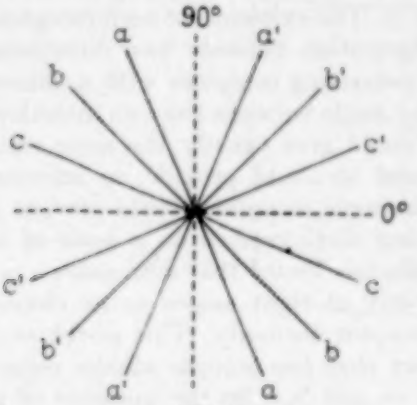

Fig. 12

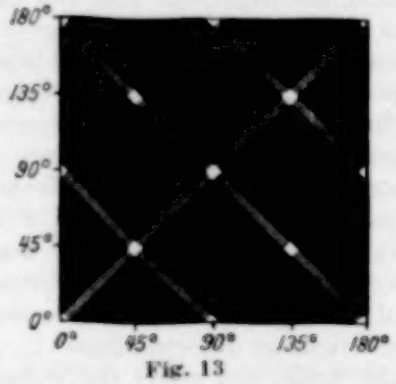

Fig. 13

Fig. 12. aa and a′a′, bb and b′b′, cc and c′c′ are pairs of characteristic directions whose two bisectors are at 0° and 90°

Fig. 13. Diagram showing the conclusions of the analysis of the two-receptor hypothesis. The ordinate measures the angle of one polarizing receptor (from the horizontal), the abscissa measures the angle of the other polarizing receptor. Any point in the diagram corresponds to a particular configuration of two characteristic directions. Configurations which are eliminated are shown white; configurations which are probably, but not certainly, eliminated are shaded; and the black areas represent configurations which are allowed. The shaded regions along the 45° line represent orientations of *one receptor* which are only *probably* eliminated

rigorously excluded, but some other configurations are unlikely for the following reasons. If the direction of the electric vector bisects the angle between the two types of receptor, each receptor receives an equal component and therefore measures an equal brightness. Suppose that the two bisectors of the characteristic directions are at 0° and 90° (Fig. 12). Then ↕ and ↔ would excite the two receptor types equally, so that ↕ could be matched by unpolarized light of an appropriate intensity, and so also could ↔ but with a different intensity[1]. Consequently, unpolarized light (of the same brightness as the polarized light) would match either ↕ or ↔ better than ↔ or ↕ (respectively), and the octopus would react to the unpolarized light as if it were more similar to one of the vectors ↕, ↔ than to the other one. But the octopuses did not react to unpolarized light as if it were more similar to ↕ than ↔ (or vice versa), as mentioned before, so the two bisectors of the characteristic directions could not lie at 0° and 90°. Similarly, because the octopuses did not

[1] Except when the two characteristic directions are at 45° and 135° respectively. The argument breaks down for this case, which has however been excluded already.

react to unpolarized light as if it were more similar to ↗ than to ↖ (or vice versa), the two bisectors of the characteristic directions could not lie at 45° and 135°. However, there are two weaknesses in this argument: (i) the octopus might be insensitive to the moderate brightness differences of different directions of the electric vector (along bisectors of the characteristic directions), and so be unable to associate unpolarized light with one of these directions rather than with the other; (ii) conversely (as mentioned on page 283), the octopus might be so *sensitive* to brightness (or colour) differences that slight mis-matches in brightness (or colour) would suffice to make the octopus distinguish unpolarized light clearly from ↕, ↗, ↔, and ↖, and so associate it with none of these directions of the electric vector. These contingencies are unlikely, but cannot be rigorously excluded.

The conclusions of the above argument are summarized in Fig. 13.

So far it has been assumed that the octopus retina contains only polarizing receptors, and that there are no receptors which respond equally to all directions of the electric vector ("isotropic receptors"). The existence of such receptors would not affect the argument that the discrimination between two directions of the electric vectors requires the existence of polarizing receptors with a characteristic direction which does not exactly bisect the angle between the two directions of the electric vector. For isotropic receptors would give exactly the same response to both directions of the electric vector, and so could provide no information to distinguish them. But the existence of isotropic receptors would prevent any two directions of the electric vector from being distinguished on a basis of intensity differences alone, since a direction of the electric vector that stimulates a polarizing receptor only weakly (because it lies nearly at right angles to its characteristic direction) would stimulate an isotropic receptor normally. This would weaken the basis of the arguments relating to the fact that the octopus always regarded unpolarized light as different from ↕, ↗, ↔ and ↖. So the presence of isotropic receptors would not affect the white "excluded" regions of Fig. 13, but would weaken the arguments indicating that the grey regions represent unlikely configurations.

Finally, it is quite possible that the retina contains polarizing receptors with more than two characteristic directions, but this gives rise to a large number of configurations of three or more charcteristic directions; as so very few of these configurations can be eliminated by our experimental data we shall not discuss these possibilities in detail.

Appendix II

Derivation of the dichroic absorption factor for a rhabdomere tubule

The dichroism of the outer segments of frog rods indicates that the rhodopsin molecules in the outer segment lamellae are oriented with their electric absorption vectors in the plane of the lamellar membrane. If it is assumed that the rhodopsin molecules are similarly oriented tangentially to the surface membrane of a rhabdomere tubule, we shall see that the tubule should absorb dichroically.

Let the direction of the electric absorption vector of each pigment molecule be specified by a unit vector $\boldsymbol{b}$ (Fig. 14). Then it is assumed, if the direction of the electric vector of plane polarized light is similarly specified by a unit vector $\boldsymbol{e}$ (having the same origin as $\boldsymbol{b}$), that when $\boldsymbol{e}$ and $\boldsymbol{b}$ are not parallel the maximal absorption of the molecule is multiplied by $(\boldsymbol{e}\cdot\boldsymbol{b})^2$.

The hypotheses of tubule ultrastructure on which the calculation is based are that the pigment molecules are uniformly distributed over the cylindrical tubule surface, with $\boldsymbol{b}$ always in the tangent plane touching the cylinder at the position of the molecule, but randomly oriented within that plane.

Let the cylindrical coordinates of a molecule be (r, ϑ, z) (see Fig. 14). Then if φ is the angle between $\boldsymbol{b}$ and the line of contact of the tangent plane at (r, ϑ, z),

$$\left.\begin{aligned} b_x &= \sin\varphi \cdot \sin\vartheta \\ b_y &= \sin\varphi \cdot \cos\vartheta \\ b_z &= \cos\varphi \end{aligned}\right\} \tag{1}$$

The probability that $\boldsymbol{b}$ lies between φ and $\varphi + d\varphi$ is $\frac{d\varphi}{2\pi}$. If the surface density of pigment molecules is σ molecules per unit area, an element of area $r d\vartheta dz$ would

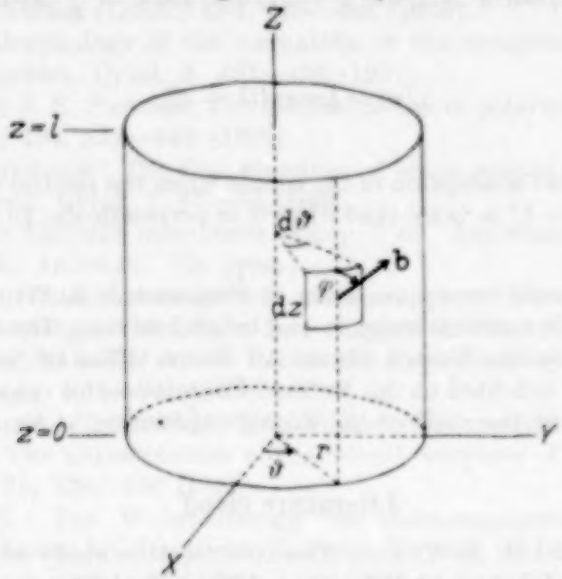

Fig. 14. Coordinates and orientation of a visual pigment molecule on the surface of a cylindrical rhabdomere tubule

contain $\sigma r d\vartheta\, dz$ molecules, and the number (on average) oriented between φ and $\varphi + d\varphi$ would be $\frac{\sigma r}{2\pi} \cdot d\varphi\, d\vartheta\, dz$. These molecules would have a relative absorption of $\frac{\sigma r}{2\pi} (\boldsymbol{e} \cdot \boldsymbol{b})^2 d\varphi\, d\vartheta\, dz$.

The total relative absorption of the whole cylindrical tubule is therefore

$$\varepsilon(\boldsymbol{e}) = \frac{\sigma r}{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{l} (\boldsymbol{e} \cdot \boldsymbol{b})^2 d\varphi\, d\vartheta\, dz. \tag{2}$$

Now

$$\begin{aligned} \boldsymbol{e} \cdot \boldsymbol{b} &= e_x b_x + e_y b_y + e_z b_z \\ &= e_x \sin\varphi \cdot \sin\vartheta + e_y \sin\varphi \cdot \cos\vartheta + e_z \cos\varphi, \text{ from (1).} \end{aligned}$$

Substituting into (2) and integrating with respect to z,

$$\begin{aligned} \varepsilon(\boldsymbol{e}) = {} & \frac{\sigma r l}{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} (e_x^2 \sin^2\varphi \cdot \sin^2\vartheta + e_y^2 \sin^2\varphi \cdot \cos^2\vartheta + e_z^2 \cos^2\varphi) d\varphi\, d\vartheta \\ & + \frac{\sigma r l}{\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} (e_x e_y \sin^2\varphi \cdot \sin\vartheta \cdot \cos\vartheta + e_y e_z \sin\varphi \cdot \cos\varphi \cdot \cos\vartheta + e_x e_z \sin\varphi \times \\ & \times \cos\varphi \cdot \sin\vartheta) d\varphi\, d\vartheta. \end{aligned}$$

On integrating with respect to θ, the second integral vanishes because

$$\int_0^{2\pi} \sin\theta \, d\theta = \int_0^{2\pi} \cos\theta \, d\theta = \int_0^{2\pi} \sin\theta \cdot \cos\theta \, d\theta = 0,$$

and we are left with

$$\varepsilon(\boldsymbol{e}) = \frac{\sigma r l}{2} \int_0^{2\pi} (e_x^2 \sin^2\varphi + e_y^2 \sin^2\varphi + 2 e_z^2 \cos^2\varphi) d\varphi = \frac{1}{2} \pi\sigma r l (e_x^2 + e_y^2 + 2 e_z^2).$$

So

$$\varepsilon(\boldsymbol{e}) = \tfrac{1}{2}\pi\sigma r l (1 + e_z^2), \tag{3}$$

since $|\boldsymbol{e}| = 1$.

Hence the relative absorption of the tubule when the electric vector lies parallel to its long axis [$e_z = 1$] is twice that when it is perpendicular to it [$e_z = 0$].

We wish to express our appreciation to Professor J. Z. Young and Dr. J. D. Robertson for their constant support and helpful advice. The research has been sponsored in part by the United States Air Force Office of Scientific Research. We are also greatly indebted to the Nuffield Foundation for continual support and to Dr. P. Dohrn and the staff of the Zoological Station at Naples for their help.

Literature cited

Boycott, B. B., and J. Z. Young: The comparative study of learning. Symp. Soc. exp. Biol., IV Animal Behaviour, 432—453 (1950).

Brown, P. K., and P. S. Brown: Visual pigments of the octopus and cuttlefish. Nature (Lond.) **182**, 1288—1290 (1958).

Collins, F. D., R. M. Love and R. A. Morton: The preparation of rhodopsin and the chemical composition of rod outer segments. Biochem. J. **48**, XXXV (1951).

— — — Studies in rhodopsin. 5. Chemical analysis of retinal material. Biochem. J. **51**, 669—673 (1952).

Denton, E. J.: The contributions of the oriented photosensitive and other molecules to the absorption of the whole retina. Proc. roy. Soc. B **150**, 78—94 (1959).

Fernández-Morán, H.: Fine structure of the light receptors in the compound eyes of insects. Exp. Cell Res., Suppl. **5**, 586—644 (1958).

Frisch, K. v.: Gelöste und ungelöste Rätsel der Bienensprache. Naturwissenschaften **35**, 12—23, 38—43 (1948).

— Die Polarisation des Himmelslichtes als orientierender Faktor bei den Tänzen der Bienen. Experientia (Basel) **5**, 142—148 (1949).

— Die Sonne als Kompaß im Leben der Bienen. Experientia (Basel) **6**, 210—221 (1950).

—, M. Lindauer u. K. Daumer: Über die Wahrnehmung polarisierten Lichtes durch das Bienenauge. Experientia (Basel) **16**, 289—301 (1960).

Goldsmith, T. H., and D. E. Phillpot: The microstructure of the compound eyes of insects. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 429—440 (1957).

Grenacher, H.: Abhandlungen zur vergleichenden Anatomie des Auges. I. Die Retina der Cephalopoden. Abh. naturforsch. Ges. Halle **16**, 209—256 (1883 bis 1886).

Hubbard, R., and St. George, R. C. C.: The rhodopsin system of the squid. J. gen. Physiol. **41**, 501—528 (1958).

Ivanoff, A., and T. H. Waterman: Factors, mainly depth and wavelength, affecting the degree of underwater light polarization. Sears Foundation: J. Marine Res. **16**, No. 3, 283—307 (1958).

Kalmus, H.: Orientation of animals to polarized light. Nature (Lond.) **184**, 228—230 (1959).

Kropf, A., P. K. Brown and R. Hubbard: Lumi- and meta-rhodopsins of squid and octopus. Nature (Lond.) **183**, 446—448 (1959).

Miller, W. H.: Morphology of the ommatidia of the compound eye of *Limulus*. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 421—428 (1957).

Moody, M. F., and J. R. Parriss: The discrimination of polarized light by *Octopus*. Nature (Lond.) **186**, 839—840 (1960).

—, and J. D. Robertson: The fine structure of some retinal photoreceptors. J. biophys. biochem. Cytol. **7**, 87—91 (1960).

Robertson, J. D.: The unit membrane. Chap. 7 of "Anatomical Society Symposium" (publ. E. Arnold). (In press.)

Schmidt, W. J.: Polarisationsoptische Analyse eines Eiweiß-Lipoid-Systems, erläutert am Außenglied der Sehzellen. Kolloid-Z. **84**, 137—148 (1938).

Schultze, M.: Die Stäbchen in der Retina der Cephalopoden und Heteropoden. Arch. mikr. Anat. **5**, 1—24 (1869).

Sjöstrand, F. S., and T. Gierer: Unpublished data quoted on p. 139 of F. S. Sjöstrand — The ultrastructure of the retinal receptors of the vertebrate eye. Ergebn. Biol. **21**, 128—160 (1959).

Stockhammer, K.: Zur Wahrnehmung der Schwingungsrichtung des linear polarisierten Lichtes bei Insekten. Z. vergl. Physiol. **38**, 30—83 (1956).

— Die Orientierung nach der Schwingungsrichtung linear polarisierten Lichtes und ihre sinnesphysiologischen Grundlagen. Ergebn. Biol. **21**, 23—56 (1959).

Sutherland, N. S.: Visual discrimination of orientation by *Octopus*. Brit. J. Psychol. **48**, 55—71 (1957).

— Visual discrimination of shape by *Octopus*. Squares and triangles. Quart. J. exp. Psychol. **10**, 40—47 (1958).

—, and W. R. Muntz: Simultaneous discrimination training and preferred directions of motion in visual discrimination of shape in *Octopus Vulgaris* Lamark. Pubbl. Staz. zool. Napoli **31**, 109—126 (1959).

Vries, H. de, and J. W. Kuiper: Optics of the insect eye. Ann. N.Y. Acad. Sci. **74**, 196—203 (1958).

Waddington, C. H., and M. Perry: Demonstration at the conference convened by the editorial board of the J. Embryol. exp. Morph., Paris, September 1959.

Waterman, T. H.: Interaction of polarized light and turbidity in the orientation of *Daphnia* and *Mysidium*. Z. vergl. Physiol. **43**, 149—172 (1960).

Wells, M. J.: Factors affecting reactions to *Mysis* by newly hatched *Sepia*. Behaviour **8**, 96—111 (1958).

Wolken, J. J.: Retinal structure. Mollusc cephalopods: *Octopus*, *Sepia*. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 835—838 (1958).

Young, J. Z.: Regularities in the retina and optic lobes of *Octopus* in relation to form discrimination. Nature (Lond.) **186**, 836—839 (1960).

— (1961). The retina of *Cephalopods* and its degeneration after optic nerve section. (To be published).

Mr. M. F. Moody,
Department of Anatomy, University College, London W. C. 1
(Great Britain)

Zeitschrift für vergleichende Physiologie 44, 292—322 (1961)

Aus dem Zoologischen Institut der Georg-August-Universität Göttingen

AKTIVITÄTSPERIODIK DES WASSERLÄUFERS *VELIA CURRENS* F.*

Von

LUDGER RENSING

Mit 23 Textabbildungen

(Eingegangen am 5. November 1960)

I. Einleitung

Eine endogene Tagesperiodik steuert bekanntlich bei Tieren und Pflanzen zahlreiche wichtige Lebensvorgänge (ASCHOFF 1958; BÜNNING 1958; HARKER 1958; PITTENDRIGH und BRUCE 1957 u. a.). Auf dieser „inneren Uhr" der Tiere beruht ihr Zeitgedächtnis und ihre Fähigkeit, sich tageszeitgerecht nach Himmelsmarken zu orientieren und eine zu jeder Tageszeit gültige Kompaßrichtung einzuhalten (BELING 1929; WAHL 1932; KALMUS 1934; RENNER 1957; v. FRISCH 1951; LINDAUER 1954; PARDI und PAPI 1953 u. a.). Durch Phasenverschiebung des tagesperiodischen Hell-Dunkel-Wechsels läßt sich die Uhr verstellen (HOFFMANN 1953; PARDI 1953/54) und in Grenzen an künstliche, kürzere oder längere Hell-Dunkel-Perioden anpassen (BIRUKOW 1956; BIRUKOW und BUSCH 1957; EMEIS 1959 u. a.). Die zugrunde liegenden physiologischen Abläufe sind jedoch ebenso wie die Taxismechanismen der Kompaßorientierung im einzelnen noch ungeklärt; erst in jüngster Zeit begann man, auch die rhythmischen Abläufe bei der Orientierung stärker zu beachten. Bei der Licht- und Schwereorientierung mancher Tiere verändert sich der Orientierungswinkel spontan in 24stündigem Rhythmus, ohne daß eine Bindung an biologisch wichtige oder erlernte Richtungen erkennbar ist (BIRUKOW 1956; BIRUKOW und OBERDORFER 1959). Diese spontane Orientierungsrhythmik scheint ebenso wie die bisher meist untersuchte lokomotorische Aktivität Ausdruck der inneren Tagesperiodik zu sein.

Für die Frage nach dem zentralnervösen Mechanismus der inneren Uhr und der kompaßtreuen Orientierung ist daher ein Vergleich zwischen Aktivitäts- und Orientierungsrhythmen besonders wichtig. Ein solcher ist bisher nur in wenigen Fällen versucht worden; HENKE (1930) untersuchte Laufaktivität und Phototaxis bei Asseln, WEYRAUCH (1930) das gleiche bei Hymenopteren, BIRUKOW (1954) beschrieb die Wirkung

* Meinem verehrten Lehrer Prof. Dr. G. BIRUKOW danke ich für die Überlassung des Themas und seine Anregungen.

aktivitätsvermindernder Narkosen beim Mistkäfer, HOFFMANN (1954) und RAWSON (1954) verglichen die rhythmischen Abläufe in beiden Funktionskreisen bei Staren. Eine vergleichende Untersuchung der Aktivitätsperiodik beim Wasserläufer *Velia currens* F. erschien unter diesen Umständen besonders aussichtsreich; zahlreiche Eigenschaften seiner Orientierungsrhythmik waren durch die Untersuchungen BIRUKOWS und seiner Schüler bekannt. Es können jedoch bekanntlich verschiedene tagesrhythmische Vorgänge bei ein und demselben Tier verschieden stark an die synchronisierenden „Zeitgeber" (ASCHOFF) gebunden sein (HOFFMANN 1954; RAWSON 1954). Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die lokomotorische Aktivität von *Velia* unter möglichst vielen Bedingungen zu untersuchen und mit den bisher vorliegenden Daten der Orientierungsrhythmik zu vergleichen.

II. Material und Methoden

Die Versuchstiere hielt ich in Aquarien mit stehendem Wasser (vgl. BIRUKOW 1956), verwendete jedoch zur Aktivitätsregistrierung meist frisch gefangene Tiere, die während des ersten Jahres (1958) aus der Umgebung von Freiburg i. Br., später (1959) von Göttingen stammten. Einige vergleichende Untersuchungen führte ich außerdem an *Gerris lacustris* L., *G. gibbifera* SCHUM. und *Gerris najas* DE GEER durch.

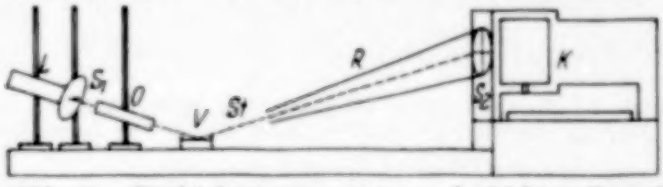

Abb. 1. Registrierungsapparatur. *L* Lichtquelle; *S* Schlitzblende; *O* Objektiv; *V* Versuchsgefäß; *St* Lichtstrahl; *R* Röhre; *K* Kymograph. Nähere Erklärung s. Text

Zur Registrierung der lokomotorischen Aktivität über längere Zeit diente folgende Apparatur (Abb. 1). Die Tiere bewegten sich einzeln oder zu mehreren auf der Wasseroberfläche in einer Glasschale (*V*) von 11 cm Durchmesser. Ein schmaler Lichtstrahl (*St*) traf die Wasseroberfläche in möglichst flachem Winkel, wurde von ihr reflektiert und durch die Bewegungen der Versuchstiere in Schwingungen versetzt. Als Lichtquelle diente eine Mikroskopierlampe (*L*) mit 6 V/5 Amp., die bis auf eine schmale waagerechte Schlitzblende (S_1) abgeschirmt war. Ein Fotoobjektiv (*O*) bildete den Schlitz nach Spiegelung auf der Wasseroberfläche auf einem Kymographen (*K*) ab, der in 1 m Abstand vom Versuchsgefäß aufgestellt war. Eine senkrechte Schlitzblende (S_2) unmittelbar davor deckte den waagerechten Lichtstreifen von 1 mm Breite und 30—40 mm Länge bis auf einen kleinen Lichtfleck von 0,5 mm² ab. Dieser schrieb auf dem lichtempfindlichen Papier bei unbewegter Wasseroberfläche die Null-Linie, jede Bewegung der Versuchstiere ließ aber den Wasserspiegel schwingen und lenkte den Lichtstrahl nach oben und unten ab. Der Lichtschreiber war durch einen Dunkelkasten und eine schwarze Röhre (*R*) gegen Außenlicht abgeschirmt. Eine Umdrehung der Kymographentrommel dauerte meist 27 Std.

Als Maß für die Aktivität der Tiere diente die Anzahl der senkrechten Striche (Abb. 2). Die Meßwerte übertrug ich auf Millimeterpapier, indem ich 3 mm über der Null-Linie ein Lineal mit Millimetereinteilung legte und die Länge der geschwärzten Strecke ausmaß. Störschwingungen ließen sich so ausschalten, da deren Amplitude kaum mehr als 3 mm betrug; die der Aktivitätszacken blieb

allerdings unberücksichtigt, doch hängt diese Meßgröße ohnehin von der Oberflächenbeschaffenheit des Wassers und von der Schwingungsrichtung des reflektierten Lichtstrahls ab.

Als Zeiteinheit galten 1, 2 oder 3 Std; dies entspricht bei einer Umdrehung in 27 Std einer Strecke von 14, 28 oder 42 mm. Bei höchstmöglicher Aktivität ist z. B. im ersten Fall während 1 Std 14 mm Schwärzung zu erwarten; auf einen dieser Werte wurden alle Meßergebnisse in Prozenten bezogen. Dieses Verfahren erschien vorteilhafter als die Berechnung der Aktivität in relativen Einheiten; Ungenauigkeiten lassen sich allerdings in beiden Fällen nicht vermeiden: bei Mittelung mehrerer Kurven ergab sich in unserem Fall eine größere Streuung der Werte, als bei der relativen Berechnung. Daher ist in den Aktivitätskurven als Maß der Streuung meist der 3fache mittlere Fehler des Mittelwertes angegeben:

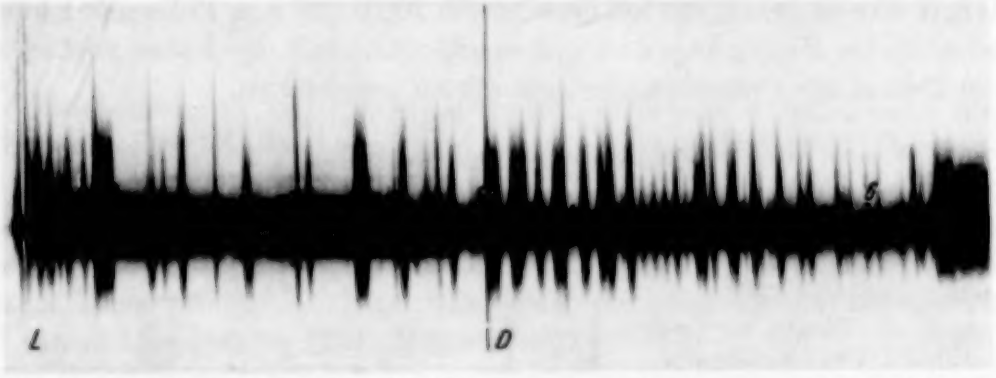

Abb. 2. Beispiel einer Registrierung über 24 Std; Aktivität eines Versuchstieres im 12:12 Std-Tag: 9—21 Uhr Licht, 21—9 Uhr Dunkelheit. Zeitmarkierung je Stunde

er erscheint als senkrechter Strich, der in den Maxima nach unten, in den Minima nach oben weist. Wenn eine Sicherung gegen andere Werte notwendig war, wurde *P* nach Tabellen von PÄTAU (1943) berechnet. Einige Fehlerquellen der Registriermethode stören nicht allzusehr: während langdauernder Registrierung ließ sich auch bei Verwendung von destilliertem Wasser und Zugabe von antiseptischen Mitteln eine allmähliche Verschmutzung der Wasseroberfläche durch Staub und Bakterien nicht vermeiden. Bei langsamer Trommeldrehung konnte die Überlagerung einzelner Schwingungen nicht berücksichtigt werden, auch wurde ein Aktivitätsmaximum manchmal dadurch verwischt, daß es zufällig in zwei benachbarte Zeiteinheiten fiel. Diese Fehler ließen sich durch höhere Umdrehungsgeschwindigkeit und durch Mittelung zahlreicher Kurven auf ein erträgliches Maß verringern.

III. Befunde

1. Aktivität im normalen 24 Std-Tag

a) Freilandbeobachtungen. Im Freien findet man Velien-Imagines während des Tages meist an schattigen Stellen ihres Biotops, unter dichten Sträuchern, überhängenden Ufern usw.; selten dagegen in der Sonne. Oft verankern sie sich mit einem Bein an Grashalmen oder ähnlichem in einer Art Lauerstellung, wie sie EKBLOM (1926) beschreibt, oder sie gleiten langsam auf der Wasseroberfläche hin und her. Wieviel Prozent der Gesamtpopulation dabei aktiv ist, läßt sich jedoch schwer beurteilen.

Nach Einbruch der Dämmerung und bei beginnender Nacht sind durchweg mehr Tiere in lebhafter Bewegung zu sehen; sie verlassen dabei sogar die sonst bevorzugte Ufernähe. Ekbloms (1926) Feststellung: „*Velia* passes the night on land in its usual resting places and moves about only by day", scheint jedenfalls für die hiesigen Veliapopulationen nicht zuzutreffen. Auch eine echte Winterruhe (vgl. Bollweg 1914; Ekblom 1926) ist bei *Velia* nicht zu erkennen. Man findet die Tiere während des ganzen Winters selbst bei tiefen Temperaturen hier und da auf dem Wasser und kann sie jederzeit aus ihrem Schlupfwinkel heraustreiben. Ähnliches haben Fallén (1826—1829) und Wesenberg-Lund (1915) beobachtet.

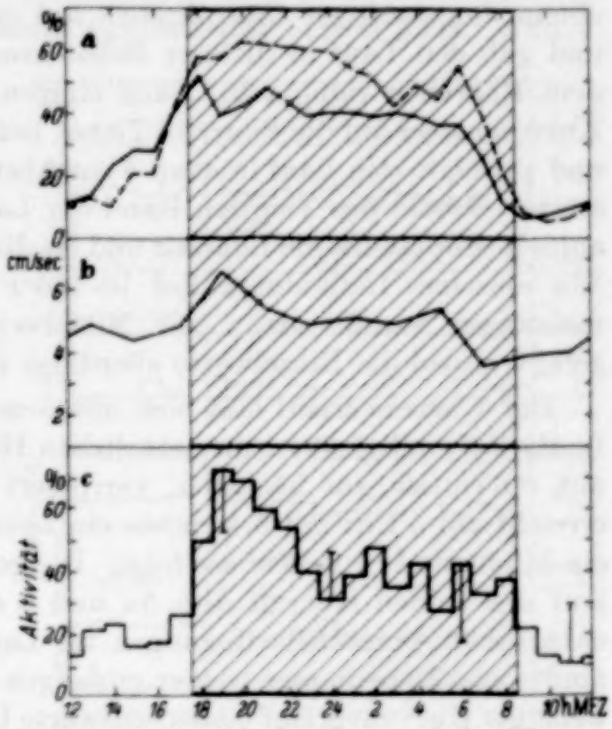

Abb. 3. a Anzahl der Tiere auf der Wasseroberfläche in Prozent der Gesamtzahl (Ordinate) während 24 Std (Abszisse) im natürlichen Hell-Dunkel-Wechsel. (- - - -) Einzelkurve von 38 Tieren (18./19. 11. 57); (——) Mittelwertskurve aus 6 Einzelkurven von je 31 Tieren (2.—7. 11. 57). b Laufgeschwindigkeit in cm/sec (Ordinate) während 24 Std (Abszisse). Jeder Punkt der Kurve ist Mittelwert aus 50—80 Messungen (15.—30. 4. 58). c Aktivität im natürlichen Hell-Dunkel-Wechsel mit zusätzlicher Beleuchtung von 250 lx zwischen 8^{30} Uhr und 17^{30} Uhr. Mittelwerte von 13 Einzelkurven (5. 11.—17. 12. 57). Ordinate: Aktivität in Prozent der höchstmöglichen, Abszisse: Uhrzeit, senkrechte Striche: 3facher mittlerer Fehler des Mittelwertes

b) Vorversuche. Ähnlich wie Park (1931) zählte ich jede Stunde die auf dem Wasser gleitenden Tiere während 24 Std. Die Aquarien standen am Nord- oder Südfenster im natürlichen Hell-Dunkel-Wechsel; im Wasser boten einige Steine Unterschlupf, an deren Unter- oder Seitenflächen sich die Velien während der Ruhezeiten aufhielten. Wie Abb. 3a belegt, steigt die Anzahl der lokomotorisch aktiven Tiere nach der Dämmerung von 20% zwischen 16—17 Uhr auf 64% um 20 Uhr an. Im Laufe der Nacht sinkt sie etwas ab, bleibt jedoch weitaus höher als am Tage und erreicht zur Zeit der Morgendämmerung mit 55% ein zweites kleineres Maximum. Zur Mittagszeit halten sich höchstens 10% der Tiere auf der Wasserpberfläche auf. Ganz ähnlich verläuft auch die Mittelwertskurve aus mehreren Tagen.

Bei höheren Wassertemperaturen von etwa 20° C aufwärts sind die Tiere jedoch zu beliebiger Tageszeit gleich häufig auf der Wasserober-

fläche anzutreffen; nur wenige halten sich an den Steinen auf. Offenbar werden ihre Bewegungen bei höheren Temperaturen lebhafter (vgl. auch weiter unten S. 299).

c) Laufgeschwindigkeit an Land. Ich setzte die Tiere einzeln in einem umgestülpten Glasröhrchen auf eine Holzplatte von 50 × 50 cm und gab den Lauf in diffuser Beleuchtung frei, sobald das Tier unter dem Röhrchen ruhig saß. Nach einigen Zentimetern setzte ich einen Kurvenmesser auf die Spur des Tieres, ließ zugleich eine Stoppuhr laufen und verfolgte den Lauf in etwa 5 cm Abstand, was die Tiere keineswegs störte. Sobald das Tier den Rand der Lauffläche erreichte oder vorher anhielt, stoppte ich die Laufzeit und las die zurückgelegte Wegstrecke ab. Ein einzelnes Individuum lief 10- oder 20mal; die rund 900 Einzelmessungen wurden dann zur Mittelwertskurve Abb. 3b zusammengefaßt, wobei die Einzelwerte allerdings ziemlich stark streuten.

Der Kurvenverlauf läßt sich mit dem der Abb. 3a vergleichen; die Laufgeschwindigkeit ist im natürlichen Hell-Dunkel-Wechsel um 19 Uhr mit 6,6 cm/sec am höchsten, verringert sich gegen Mitternacht und erreicht um 5 Uhr mit 5,4 cm/sec ein zweites Maximum, dem um 7 Uhr ein Minimum mit 3,5 cm/sec folgt. Die geringen Abweichungen im Verlauf der beiden Kurven Abb. 3a und b dürften durch die relativ unnatürlichen Versuchsbedingungen im Laufversuch bedingt sein; man mußte die Tiere immer wieder einfangen und laufen lassen. Trotzdem weist der Kurvenverlauf bemerkenswerte Übereinstimmungen auf: offenbar treten in beiden Fällen während der Dunkelphase zwei Maxima auf.

d) Aktivität auf der Wasseroberfläche. Wie oben S. 293 erläutert, wurden 1—4 Tiere in die Versuchsschale gesetzt; entweder nur Männchen oder nur Weibchen. Die ersten Versuche liefen im natürlichen Hell-Dunkel-Wechsel; später gab ich am Tage von 9—18 Uhr zusätzlich diffuses Licht von etwa 250 lx. In der Versuchsschale diente ein etwa rechteckiger Stein, der etwas aus dem Wasser herausragte, als Unterschlupf und „Ankerplatz", doch zeigte sich später, daß Velien anscheinend ebenso gut auch auf dem Wasser bewegungslos ruhen können.

Wie die Mittelwertskurve Abb. 3c zeigt, weist die Aktivität wiederum ein Hauptmaximum um 19 Uhr auf, während die Minima bei 24 Uhr und 11—12 Uhr liegen. Außerdem erscheinen mehrere kleinere Nebenmaxima zwischen 2—4 Uhr und 6—8 Uhr; diese prägen sich wegen der zeitlichen Unterschiede weniger aus.

Die 3 Kurven Abb. 3a—c lassen, obwohl die Registriermethoden verschieden waren, die wesentlichen Merkmale der Aktivitätsperiodik von *Velia* bereits klar erkennen: Wasserläufer sind nacht- bzw. dämmerungsaktive Tiere; ihr Aktivitätsverlauf weist 2 Gipfel auf: ein Hauptmaximum während und nach der abendlichen Dämmerung und ein Neben-

maximum zur Zeit der Morgendämmerung. Dazwischen liegt jeweils ein mehr oder weniger ausgeprägtes Minimum.

Um die Zeitgeber dieser Periodik näher kennenzulernen, hielt ich Velien im Kunsttag von 9 Std Hell- und 15 Std Dunkelzeit bei konstanter Temperatur von 15° C in einer schall- und erschütterungsfreien Temperaturkammer. Die Beleuchtungsintensität betrug 50 lx. Abb. 4 zeigt, daß die Einzeltiere starke individuelle Unterschiede in der Form und in der Amplitude der Aktivitätsperiodik aufweisen. Sie sind wahrscheinlich ebenso durch nichtkontrollierbare innere Faktoren bedingt, wie auch durch die S. 294 erörterten Grenzen der Registriermethode. Man könnte unter diesen Umständen bezweifeln, ob es einen Sinn hat, Mittelwertskurven zu bilden, wenn die 3fache mittlere Streuung des Mittelwertes σ_m im Grenzfall bis zu 27% nach oben und unten betragen kann (Abb. 4). Trotz dieser Bedenken erlaubte die Mittelwertsbildung, wie weiter unten gezeigt werden soll, reproduzierbare Befunde und Vergleiche.

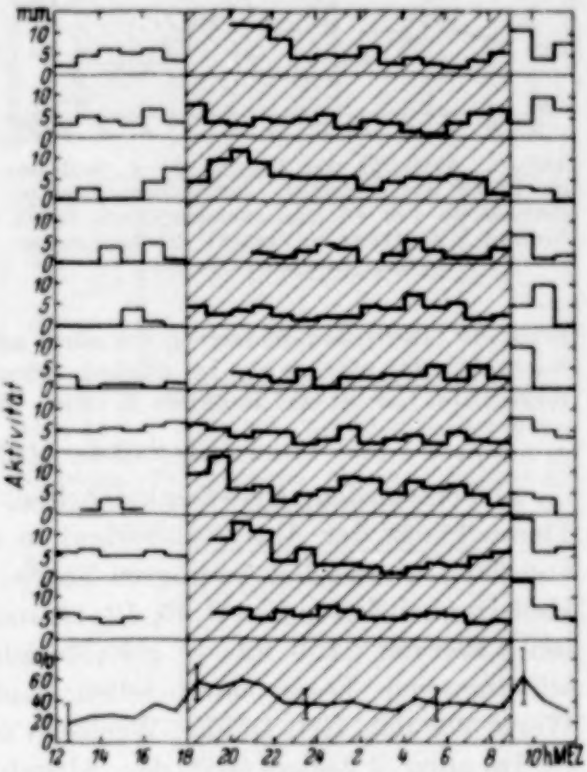

Abb. 4. *1—10.* Einzelkurven der Aktivität im 9:15stündigen Kunsttag und ihre Mittelwertskurve. Beleuchtung 50 lx. Ordinate: Aktivität in Millimeter Schwärzung pro Stunde; Abszisse: Uhrzeit (28. 1.—9. 2. 59)

So zeigt die Mittelwertskurve von 10 Tieren (Abb. 4, unten), daß der Hell-Dunkel-Wechsel als Zeitgeber die Aktivität entscheidend beeinflußt: sie ist am stärksten am Anfang der Dunkelphase und der Hellphase; das eine Maximum ist steil, das andere flacher. Alle kleineren Maxima und Minima zwischen den Phasengrenzen treten dagegen regellos zu verschiedenen Uhrzeiten auf.

e) Aktivität der Larven. Im Freiland beobachtet man die jüngsten Larvenstadien meist auf ruhigem Wasser zwischen Grashalmen und anderem Bewuchs. Die älteren sind ebenfalls auf ruhigen, jedoch offenen Stellen des Gewässers anzutreffen, häufig sogar im Sonnenlicht auf relativ warmem Wasser. Im 2.—4. der insgesamt 5 Larvenstadien ist die Tagesaktivität tatsächlich höher als bei den Imagines; die einzelnen Stadien unterschieden sich jedoch nicht wesentlich voneinander, so daß

man die Werte aller zu einer Mittelwertskurve (Abb. 5) zusammenfassen kann. Ihr Verlauf stimmt zum Teil mit dem der Erwachsenen überein; so treten die beiden Maxima auch hier zu Beginn der Dunkel- und Hellphasen auf; das Nachtminimum ist jedoch in die Morgenstunden verschoben, das Morgenmaximum ist ausgedehnter, während das darauffolgende Tagesminimum infolge der erhöhten Aktivität kaum erscheint.

Abb. 5. Aktivität der Larven (2.—4. Stadium) im 12:12 Std-Kunsttag. Beleuchtung 250 lx. Mittelwerte von 16 Einzelkurven (Juni 1959). Ordinate: Aktivität in Prozent der höchstmöglichen; Abszisse: Uhrzeit

Soweit bekannt, verhalten sich auch andere hemimetabole Insekten ähnlich; KALMUS (1938) fand bei Larven von *Carausius morosus* weniger ausgeprägte Aktivitätsunterschiede als bei Imagines; nach EIDMANN (1956) sind die Larven vor allem am Tage aktiver als Erwachsene, deren Nachtaktivität stärker ist. Im übrigen jedoch stimmte auch hier der Aktivitätsverlauf von Larven und Imagines in vielen Merkmalen überein.

2. Einfluß der Außenfaktoren

a) Verschiedene Hell-Dunkel-Zeiten. Wohl bei allen bisher geprüften Tieren hängt der Aktivitätsverlauf in unseren geographischen Breiten von der jahreszeitlich bedingten Tages- und Nachtlänge ab. So bot ich Hell-Dunkel-Zeiten von 9:15, 12:12 und 15:9 Std. Die daraus ermittelten 3 Kurven (Abb. 6a—c) glättete ich über 3 Werte, um die Hauptschwingungen besser darzustellen; dadurch erscheinen allerdings die Werte vor den Hell-Dunkel-Wechseln etwas zu hoch.

In allen 3 Fällen tritt das Abendmaximum unabhängig von der Ortszeit zu Beginn der Dunkelphase ein; dies bestätigte sich auch in allen späteren Versuchen. Das morgendliche Maximum hält dagegen anscheinend ein Intervall von 11—12 Std nach dem Abendmaximum ein; in Kurve *a* erscheint es erst in der Hellphase um 8 Uhr, in *b* fällt es genau mit dem Dunkel-Hell-Wechsel zusammen, in *c* entspricht ihm wahrscheinlich das kleine Maximum zwischen 4—5 Uhr, doch läßt es sich statistisch nicht gegen die anderen Werte sichern. Die Unabhängigkeit des Morgenmaximums vom Dunkel-Hell-Wechsel zeigte sich später auch bei Versuchen im Dauerdunkel (vgl. weiter unten, S. 309). Neben dieser anscheinend inneren Beziehung zwischen dem abendlichen Hauptmaximum und dem morgendlichen Nebenmaximum wirkt aber wohl auch der Beleuchtungsbeginn; dieser „Licht-Ein-Effekt" macht sich vor allem in *c* bemerkbar. Auf diesen Effekt soll erst weiter unten näher eingegangen werden (vgl. S. 318). Das Minimum der Tages- und Nachtaktivität liegt ungefähr in der Mitte zwischen den beiden Maxima, außer bei *a*, wo das Nachtminimum um 1—2 Std verspätet eintritt.

b) Einfluß der Temperatur. Ich registrierte die Aktivität von Einzeltieren in der Klimakammer bei 5°, 15°, 25° und 30° C und mittelte für jede Temperatur 10 Einzelkurven. Die Hellphase dauerte von 9—18 Uhr bei einer Beleuchtungsintensität von 50 lx.

Der Aktivitätsverlauf bei 5° C (Abb. 7) weist die schon bekannten Maxima nach 18 Uhr und 9 Uhr auf. Besonders das Nachtminimum ist sehr ausgedehnt; das Tagesminimum liegt zwischen 12—13 Uhr. Bei 15° C sind die tageszeitlichen Aktivitätsunterschiede besonders stark ausgeprägt: das 18 Uhr-Maximum erreicht 58%, das 9 Uhr-Maximum sogar 64% der höchstmöglichen Aktivität gegenüber 19% um 12 Uhr und 30% um 3 Uhr. Bei 25° erniedrigt sich die Aktivität in den Morgen- und Abendstunden und erhöht sich dafür in den Nacht- und Mittagsstunden, so daß insgesamt ihr Verlauf ausgeglichener ist. Dennoch bleibt auch hier der Einfluß des Hell-Dunkel-Wechsels durchaus bestehen, obwohl sich die Temperaturwirkung stärker geltend macht. Bei 30° C endlich steigt die Aktivität überall stark an; die Werte schwanken nur noch im Bereich zwischen 60—90%; auch hier ist jedoch noch ein Licht-aus- bzw. -an-Maximum erkennbar. Ob

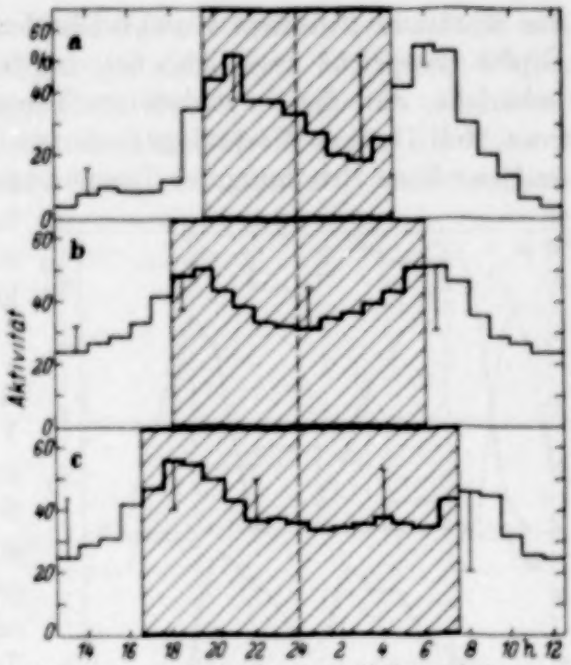

Abb. 6a—c. Aktivität bei Hell-Dunkel-Zeiten von a 15:9 Std; b 12:12 Std; c 9:15 Std im Kunsttag. Zur besseren Übersicht wurden die geglätteten Mittelwertskurven um 1—2 Std gegenüber der MEZ verschoben

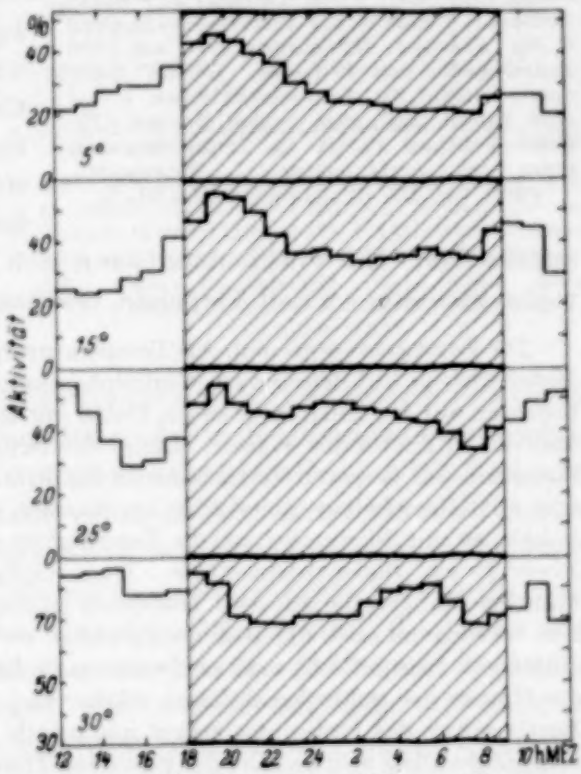

Abb. 7. Aktivität bei verschiedenen Temperaturen im 9:15 Std-Kunsttag. Geglättete Mittelwertskurven von je 10 Einzelkurven; bei 30° von 3 Einzelkurven (29. 1.—16. 3. 59)

das Maximum zwischen 4 und 6 Uhr dem vermutlich endogenen zweiten Gipfel entspricht (vgl. Abb. 6c), ist fraglich. Im ganzen zeigte sich jedenfalls, daß die verschiedenen Temperaturen die Grundformen des vom Hell-Dunkel-Wechsel gesteuerten Aktivitätsverlaufes wenig verändern. Eine Erhöhung der Temperatur bewirkt lediglich einen stärkeren Ausgleich der Aktivitätsunterschiede, die bei 30° am kleinsten sind.

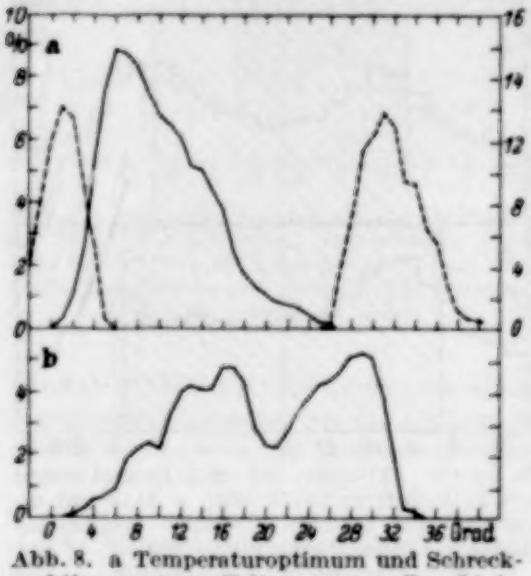

Abb. 8. a Temperaturoptimum und Schreckreaktionen von *Velia currens* F. Linke Ordinate: Prozente der Tiere (——) je Grad C der Abszisse; Mittelwertskurve aus 1000 Einzelwerten von 30 Tieren. Rechte Ordinate: Anzahl der Schreckreaktionen (- - - -) zum kalten und zum heißen Bereich (Januar—Februar 1958); b Temperaturoptimum von *Gerris lacustris* L. Mittelwertskurve aus 400 Einzelwerten (Mai 1958)

c) Temperaturoptimum und Aktivitätsverlauf; ökologische Vergleiche. Um den Zusammenhang zwischen Temperatureinfluß, Aktivitätsverlauf und allgemeinen ökologischen Bedingungen näher kennenzulernen, untersuchte ich vergleichend das Temperaturoptimum und die Aktivität von *Velia currens* F. und von Vertretern der nah verwandten Gattung *Gerris*, die gelegentlich im selben Biotop vorkommt. Die geprüften Arten *Gerris lacustris* L., *G. gibbifera* SCHUM. und *G. najas* DE GEER sind im allgemeinen auf größeren Wasserläufen oder Teichen anzutreffen. Ihr Vorkommen kann sich jedoch mit dem der Velien, die meist kleinere, schnell fließende Gewässer bevorzugen, überschneiden.

Die Vorzugstemperaturen. Als Temperaturorgel diente eine 85 cm × 35 cm große Metallschiene, auf der eine cm-Einteilung eingeritzt war. Die umgebogenen Enden tauchten auf der einen Seite in ein Gefäß mit festen Kohlensäurestückchen, auf der anderen in kochendes Wasser. Längs der Schiene stieg die Temperatur ungefähr linear an, bei längerer Versuchsdauer für je 2 cm um 1° C. Die ganze Apparatur war mit Glasscheiben überdeckt; am warmen und kalten Ende befand sich je ein Schälchen mit Siliciumgel, um die Feuchtigkeit einigermaßen gleichmäßig zu halten, sowie je ein Bodenthermometer. Diese einfache Methode bewährte sich trotz mancher Mängel; die auf dem Trockenen laufenden Tiere richten sich augenscheinlich vorwiegend nach der Bodentemperatur, sie betasten die Lauffläche oft mit den Antennen. Amputierte man nach und nach die Antennenglieder, so verschob sich die Grenze der Schreckreaktionen stärker zum heißen bzw. kalten Ende hin. Zur Bestimmung des Optimums setzte ich jeweils 5—10 Tiere in die Apparatur und bestimmte alle 3 min den Ort der ruhenden Tiere; laufende wurden nicht registriert, doch reizte ich längere Zeit an einem Platz sitzende Tiere leicht mit einem Pinsel, um sie zum Laufen anzuregen, ebenso solche, die in zu heiße oder zu kalte Bereiche gerieten.

Abb. 8a belegt, daß Velien Temperaturen zwischen 4—16° C eindeutig bevorzugen; die Verteilungskurve steigt steil von 0° auf 6° C an und fällt langsam zum wärmeren Ende hin ab. Vergleicht man damit die Häufigkeit der Schreckreaktionen (HERTER 1924), die die Tiere in bestimmten Temperaturbereichen zeigten (Abb. 8a, unterbrochene Linie), so zeigt sich, daß ihr Maximum im warmen Gebiet bei 30—32° C, im kalten aber bei 1—2° C liegt. Im „Toleranzbereich" zwischen diesen beiden Extremen liegt, wie erwartet, das Temperaturoptimum.

Die Verteilungskurve von *Gerris lacustris* L. (Abb. 8b) verläuft ganz anders; sie weist 2 Maxima auf, nämlich bei 16—17° C und 28—30° C.. Der bevorzugte Temperaturbereich ist ausgedehnter als bei *Velia*, er reicht von 12—31° C. Offenbar ist *Gerris* weit weniger als *Velia* an einen bestimmten Temperaturbereich gebunden. *Gerris lacustris* L. kommt tatsächlich sowohl auf wärmeren stehenden Gewässern, als auch auf kälteren Bächen vor.

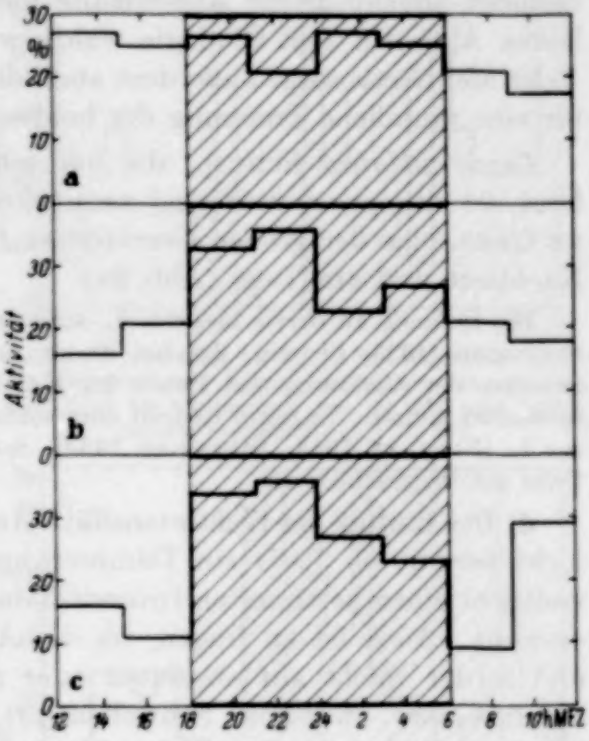

Abb. 9. a Aktivität von *Gerris lacustris* L. in einem 12:12 Std-Kunsttag. Mittelwerte aus 13 Einzelkurven (Mai 1958); b Aktivität von *Gerris gibbifera* SCHUM. Mittelwerte aus 7 Einzelkurven (Mai 1958). c Aktivität von *Gerris najas* DE GEER. Mittelwerte aus 5 Einzelkurven (Oktober 1958)

Die Aktivität der Gerrisarten. In Abb. 9a sind die mit der gleichen Methode wie bei Velien gewonnenen Aktivitätswerte von *Gerris lacustris* L. dargestellt. Hier zeigt sich weder in den Einzelkurven noch in der Mittelwertskurve eine Abhängigkeit vom Hell-Dunkel-Wechsel oder von der Beleuchtung. Die Einzelkurven streuen allerdings noch stärker als bei Velien und die Mittelwertskurve verläuft daher ohne ausgeprägte Maxima und Minima. Vergleicht man jedoch die Einzelkurven genauer, so finden sich häufig Maxima zwischen 12—15 Uhr, 0—3 Uhr oder 3—6 Uhr; Aktivitätsminima können zwischen 21—24 Uhr und 9—12 Uhr liegen. *Gerris lacustris* L. kann also sowohl am Tage als auch in der Nacht aktiv sein. STEINIGER (1933) beobachtete dagegen nachts bei Gerriden nur selten Bewegungen.

Die Aktivität von *Gerris lacustris* L. hängt also weit weniger als bei Velien von den Hell-Dunkel-Phasen und von der Temperatur ab. Velien

sind dagegen nachtaktiv, was gut zu ihrem scharf begrenzten Optimum bei tieferen Temperaturen paßt. Die unterschiedliche Aktivitätsverteilung und die verschiedenen Temperatur-Optima sorgen wohl dafür, daß die beiden verwandten, auf die gleichen Beutetiere angewiesenen Gattungen nebeneinander im gleichen Biotop bestehen können. Eine ähnliche physiologische Abgrenzung hatte PARK (1940) bei der nächtlichen Aktivität und Ökologie waldbewohnender Tiere vermutet. Bei *Velia* und *Gerris* sorgt außerdem auch die Beschaffenheit des Gewässers für eine räumliche Trennung der beiden Gattungen.

Gerris gibbifera SCHUM., die ich selten mit *Velia* vergesellschaftet fand, ist dagegen vorwiegend nachtaktiv (Abb. 9b). Bei *Gerris najas* DE GEER, eine der großen Gerrisarten, findet sich je ein Maximum zur Nachtzeit und am Tage (Abb. 9c).

Die Befunde zu *Gerris lacustris* L. stimmen gut mit den Beobachtungen von STEINIGER (1933) überein, der bei dieser Art ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen der Auslösung und Dauer der Katalepsie und dem Tag-Nacht-Wechsel feststellen konnte. Dagegen besteht eine solche Abhängigkeit bei *Dixippus morosus* L. (EIDMANN 1955; STEINIGER 1933), deren Aktivitätsverlauf mit dem von *Velia* gut vergleichbar ist.

d) Der Einfluß der Lichtintensität. Aus den bisherigen Befunden geht nicht hervor, ob *Velia* ein Dämmerungs- bzw. ein Nachttier ist oder vielleicht einen bestimmten Intensitätsbereich der absoluten Dunkelheit vorzieht. Auch ist zu fragen, ob die Aktivitätsunterschiede am Tage und in der Nacht auf absoluten oder relativen Helligkeitsdifferenzen beruhen bzw. welchen Schwellenwert die Intensitätsverminderung haben muß, um ein abendliches Maximum hervorzurufen.

Ich hielt die Tiere im normalen 12:12 Std-Kunsttag bei einer Beleuchtungsintensität von 50 lx. 1—2 Std vor dem Ausschalten der Lampe verringerte ich die Beleuchtungsintensität durch Wegrücken der Lichtquelle um bestimmte Beträge oder durch einen Schiebewiderstand und las später im Aktogramm ab, wie sich die Intensitätsverminderung ausgewirkt hatte. Dabei wertete ich nur den unmittelbar auf die Intensitätsveränderung folgenden Aktivitätsschub aus.

Erniedrigt man die Intensität von 50 auf 2—5 lx (Abb. 10), so reagieren die Tiere mit einem deutlichen, allerdings kurzen Aktivitätsschub; 1—2 Std später wiederholt er sich nach totaler Verdunkelung, dauert dann aber länger. Verdunkelt man um einen geringeren Betrag, z. B. von 50 auf 20 oder 30 lx, dann bleibt das Ergebnis ungefähr gleich; beträgt aber der Unterschied nur 10 lx, so bleibt die Reaktion aus oder wird undeutlich. Der „Aus-Effekt" läßt sich also in Grenzen auch durch Intensitätsverminderung auslösen; quantitative Beziehungen zwischen dem Ausmaß der Beschattung und der Stärke des Effektes ließen sich jedoch nicht ermitteln. Auch im Freiland dürfte ein oberschwelliger Intensitätsabfall in der Abenddämmerung bereits ausreichen; vermutlich stellt sich das Abendmaximum der Aktivität mit zunehmender

Dunkelheit allmählich ein. Man kann daher Velien den dämmerungs- *und* nachtaktiven Tieren zurechnen.

Ähnlich wie bei der Orientierungsperiodik der Velien (Emeis 1959) kommt es auch beim Aktivitätsverlauf auf *relative* Helligkeitsunterschiede zwischen den beiden Phasen an; bietet man als Tagesintensität 50 lx, in der Nacht 3 lx, danach am Tage 3 lx und zur Nachtzeit völlige Dunkelheit, so stimmt der Aktivitätsverlauf, wie Abb. 11 zeigt, in beiden Fällen weitgehend überein. Vermutlich dürfte dabei auch der Adaptationszustand des Auges eine Rolle spielen.

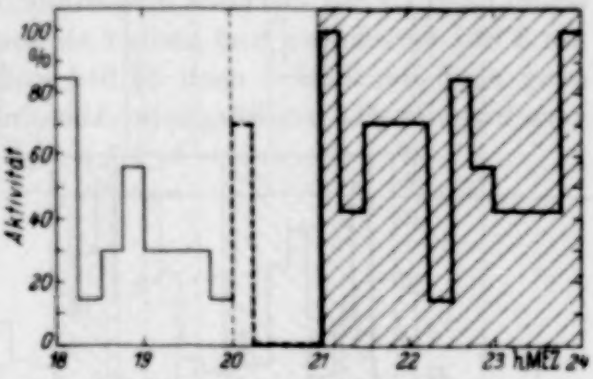

Abb. 10. Aktivität im 12:12 Std-Kunsttag. Um 20 Uhr wird die Beleuchtungsintensität von 50 auf 2—5 lx vermindert, um 21 Uhr wird vollständig verdunkelt (6./7. 7. 59)

e) Inversion der Hell-Dunkel-Phasen. Die Aktivität der Versuchstiere wurde zuerst im Kunsttag von 15 Std hell zu 9 Std dunkel registriert, da die Versuche im Juni stattfanden. In der ersten Versuchsreihe verlängerte ich die D-Phase um 12 Std und bot anschließend den inversen Tag mit den gleichen Hell-Dunkel-Zeiten; in der zweiten Versuchsreihe verlängerte ich die H-Phase um 12 Std; in der dritten unterbrach ich die lange Dunkel- bzw. Hellphase durch je eine Hell- bzw. Dunkelzeit von 3 Std.

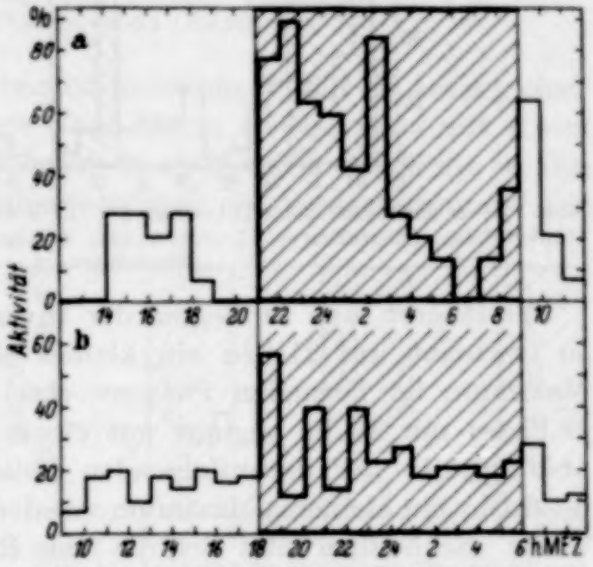

Abb. 11. a Aktivität im 12 : 12 Std-Kunsttag bei einem Tag-Nacht-Lichtverhältnis von 50:3 lx (Einzelkurve 18./19. 9. 59); b Aktivität im 12:12 Std-Kunsttag bei einem Tag-Nacht-Lichtverhältnis von 3:0 lx (Einzelkurve 12./13. 9. 59)

Wie Abb. 12 zeigt, trat in der ersten Versuchsreihe zu Beginn der langen D-Phase zunächst das normale hohe Abendmaximum auf, danach ein zweites zwischen 6—9 Uhr, das dem normalen Morgenmaximum entspricht. Die erste inverse Hellphase beginnt mit sehr niedriger Aktivität, die dann aber schnell zu einem Gipfel um 24 Uhr ansteigt. Nach Verdunkelung um 9 Uhr tritt trotzdem noch ein hohes Licht-aus-Maximum auf, das bis zum Anfang der nächsten Hell-Phase

wieder abklingt. In dieser erscheint nach 24 Std nur noch ein kleines Maximum; in der nachfolgenden inversen D-Phase erhöht sich die Aktivität abermals. Nimmt man 6 Uhr der verlängerten Dunkelphase als den Beginn der Inversion an, so hat sich der Aktivitätsrhythmus schon nach 15 Std merklich umgestellt; das frühere Abendmaximum ist um 3 Std verschoben und kleiner als sonst. Nach 39 Std ist die Anpassung noch deutlicher, nach 51 Std vollkommen; während dieser Zeit verschwindet das ursprüngliche Abendmaximum nach und nach.

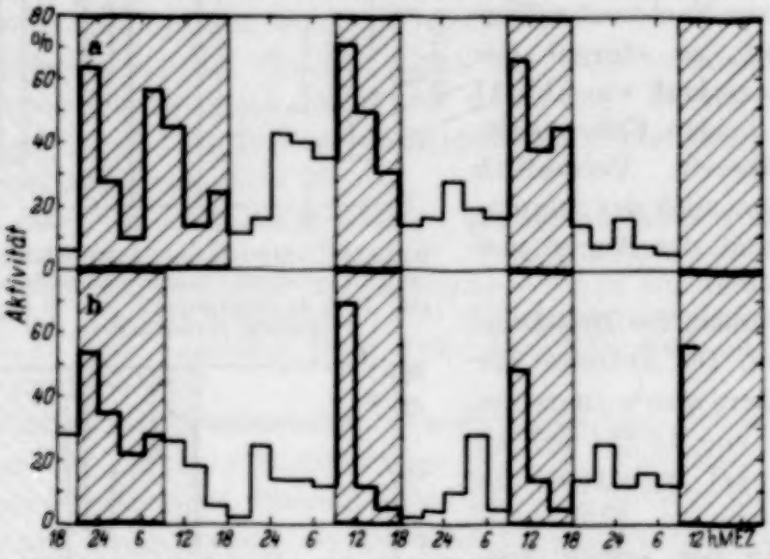

Abb. 12. a Aktivität nach Inversion des 15:9 Std-Kunsttages durch Verlängerung der Dunkelphase. (Einzelkurve 17.—21. 6. 58); b Ebenso durch Verlängerung der Hellphase (Einzelkurve 1.—5. 7. 58)

Verlängert man zu Beginn der Inversion die Hellphase (Abb. 12b), so erscheint um 21 Uhr ein kleines Maximum, das dem Licht-aus-Maximum im normalen Phasenwechsel entspricht. Die erste inverse D-Phase um 9 Uhr beginnt mit einem starken Maximum, das rasch abklingt. In der darauffolgenden Hellzeit erscheint wieder zwischen 3—6 Uhr ein kleineres Maximum vor dem inversen Licht-aus-Gipfel um 9 Uhr. Schließlich setzt sich die neue Rhythmik durch, und nach dem dritten Durchgang ist die Tagesaktivität nur noch gering. Auch hier beginnt die Anpassung an den verkehrten Tag praktisch sofort; nach etwa 52 Std ist sie vollkommen.

Die dritte Versuchsreihe brachte gegenüber den oben geschilderten keine wesentlichen Unterschiede; die vollständige Inversion verlief etwas rascher.

Nach ASCHOFF (1958) beträgt die Inversionszeit für die meisten Rhythmen im Mittel 3,8—8,5 Tage, *Velia* brauchte nach BIRUKOW u. BUSCH (1957) für die Umstimmung der Orientierungsrhythmik 36—54 Std, wobei die endgültige Inversion nach 54 Std eintrat. Die für die Aktivität gefundenen Umstimmungszeiten von 51—52 Std stimmen damit gut überein und bestätigen die starke Außenbedingtheit der Velienrhythmik.

f) Einfluß verschiedener Hell-Dunkel-Zeiten. *8 : 8 Std.* Die einzelnen Hell-Dunkel-Phasen lagen in der Zeit von 2—10 Uhr, 10—18 Uhr und 18—2 Uhr; die Hell- bzw. Dunkel-Phasen wiederholten sich alle zur

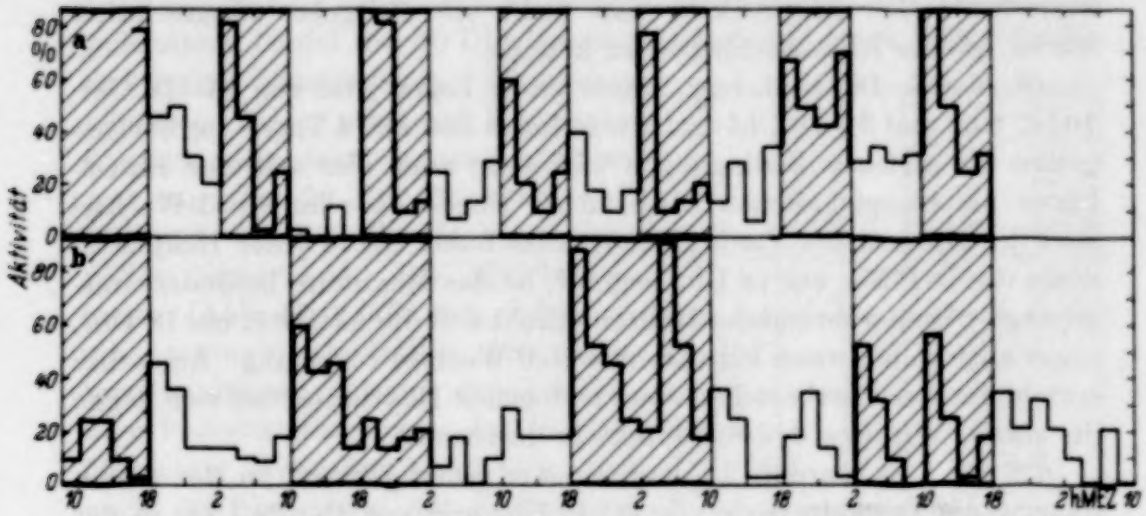

Abb. 13. a Aktivität im 8stündigen Phasenwechsel. Einzelkurve 2.—6. 2. 59). b Aktivität im 16stündigen Phasenwechsel. Einzelkurve 7.—12. 3. 59)

gleichen Uhrzeit. Der Versuch begann meist um 10 Uhr zu Anfang einer Hell-Phase und dauerte mehrere Tage bis zu sieben, stets mit einem Einzeltier. Die Temperatur schwankte in einigen Versuchen um wenige Grade (3—4° C) gemäß dem Temperaturgang des Versuchsraumes. Die Beleuchtungsintensität betrug in den Sommerversuchen etwa 250 lx, in den Frühjahrsversuchen 200 lx.

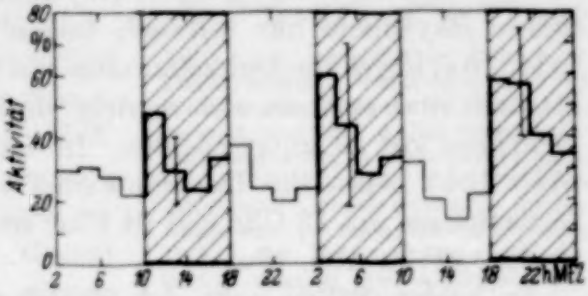

Abb. 14. Aktivität im 8stündigen Phasenwechsel. Mittelwerte aus 17 Einzelkurven (Juli—August 1958, März 1959)

Wie Abb. 13a als Beispiel für eine Einzelkurve zeigt, sind von Anfang an die Dunkelmaxima höher als die der Hellzeiten, unabhängig davon, ob die Verdunkelung in die Zeit des natürlichen Hell-Dunkel-Wechsels fällt oder nicht. Dies ist vom ersten bis zum letzten 8 Std-Phasenwechsel der Fall; nichts deutet darauf hin, daß die Tiere sich erst allmählich an den neuen Rhythmus anpassen. Nicht ganz so regelmäßig folgen die Licht-an-Maxima aufeinander: am stärksten prägen sie sich aus, wenn die Hellphase um 8 Uhr beginnt, d. h. zur Zeit des „natürlichen" Abendmaximums. Verhältnismäßig klein sind sie, wenn die Hellzeit um 2 Uhr oder um 10 Uhr beginnt. Dasselbe zeigt sich auch in der Mittelwertskurve (Abb. 14).

So scheint also im 8stündigen Phasenwechsel eine endogene Komponente des Aktivitätsrhythmus mitzuwirken, die die neuen Maxima und Minima im Sinne des „natürlichen" 24stündigen Aktivitätsverlaufes beeinflußt. Die Möglichkeit, daß nicht alle Zeitgeber ausgeschaltet waren, glaube ich ausschließen zu können.

16:16 Std. Die Hell- bzw. Dunkelzeiten liegen jetzt von 18—10 Uhr, 10—2 Uhr und 2—18 Uhr und wiederholen sich alle 4 Tage. Im übrigen gelten die gleichen Bedingungen wie oben; auch hier soll eine Einzelkurve als Beispiel dienen (Abb. 13b). Ebenso wie im 8 Std-Wechsel sind die Maxima bei Verdunkelung stets höher als in jeder Hellphase; wenn die D-Phase um 18 Uhr beginnt, ist das Maximum besonders ausgeprägt. Auch während der Hellzeit erhöht sich die Aktivität um 18 Uhr, sogar auch dann, wenn kein Dunkel-Hell-Wechsel voranging. Auch dies spricht für das Fortbestehen eines endogenen Rhythmus, der sich gegen die starke Wirkung des Außenfaktors durchsetzt.

6:6 Std. Es wurden 2 Versuchsreihen durchgeführt; in der ersten dauerte die Dunkelperiode von 6—12 Uhr und von 18—24 Uhr; in der zweiten von 0—6 Uhr und von 12—18 Uhr. Die Versuche der ersten Reihe begannen meist um 18 Uhr, die der zweiten meist um 12 Uhr, doch wurde die erste 6:6 Std-Periode bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da sie häufig zu hohe Aktivitätswerte ergab. Die Beleuchtung war im ersten Fall 500 lx, im zweiten etwa 250 lx.

Auch hier sind die Einzelkurven keineswegs einheitlich; es gibt Tiere, die eine nahezu ideale 6:6 Std-Rhythmik zeigen, während andere dem neuen Rhythmus nur schwach folgen. In der ersten Versuchsreihe (Abb. 15a) liegen die Dunkelmaxima um 18 Uhr bzw. 6 Uhr; die Licht-an-Maxima sind zwar an sich niedrig, doch von den übrigen Werten der Hellphase gut zu unterscheiden. In den Versuchen der zweiten Reihe (Abb. 15b) liegen die Dunkelmaxima entsprechend der verschobenen Dunkelphase um 12 Uhr und 24 Uhr; im übrigen verläuft die Aktivität ähnlich wie in Abb. 15a.

In beiden Fällen paßt sich also der Aktivitätsverlauf dem 6 Std-Phasenwechsel sehr gut an; bei den Einzelversuchen war die Umstellung schon in der ersten Periode zu erkennen. Diesem Wechsel folgen die Velien sogar besser als dem 8stündigen, vermutlich weil er dem normalen diphasischen Ablauf besser entspricht und keine Interferenzen mit dem 24 Std-Rhythmus aufweist (vgl. Bünning 1958). Eine merkliche Amplitudenverringerung der Dunkelmaxima, wie sie bei Annahme eines Kippschwingungssystems zu fordern wäre, war jedoch noch nicht festzustellen; daher prüfte ich den Einfluß noch kürzerer Hell-Dunkel-Wechsel.

4:4 Std. Die Dunkelzeiten lagen von 4—8 Uhr, 12—16 Uhr und 20—24 Uhr; die Versuche begannen meist um 20 Uhr. Es wurden jeweils 1—2 Tiere registriert bei einer Beleuchtung von 500 lx.

Die Einzelkurven waren wiederum uneinheitlich; in einigen war die Umstellung fast vollkommen, in anderen kaum zu erkennen. In einem Versuch vom 20. bis 23. 2. 59 waren z. B. die Dunkelmaxima nach 4, 12 und 20 Uhr während 56 Std ungefähr gleich hoch, und nur der ausgedehntere Gipfel des 20 Uhr-Maximums ließ auf einen fortlaufenden endogenen 24stündigen Rhythmus schließen. Dieser prägt sich in anderen Kurven ganz deutlich aus; zuweilen trat nur das 20 Uhr-Maximum auf, während das 12 Uhr-Maximum fast völlig verschwand. Die Mittelwertskurve (Abb. 15c) läßt sich daher als eine normale 24stündige Aktivitätskurve auffassen, der sich eine 4:4stündige Periodik überlagert; das 20 Uhr-Maximum dominiert eindeutig, und auch die Verteilung der Hellminima paßt gut dazu: das Minimum zwischen 3 und 4 Uhr ist am schwächsten ausgeprägt, jenes zwischen 11—12 Uhr am stärksten. Licht-ein-Effekte treten überhaupt nicht mehr auf, aber auch die auf die vorangegangene Hellphase bezogene Amplitude des Licht-aus-Effekts verringert sich deutlich.

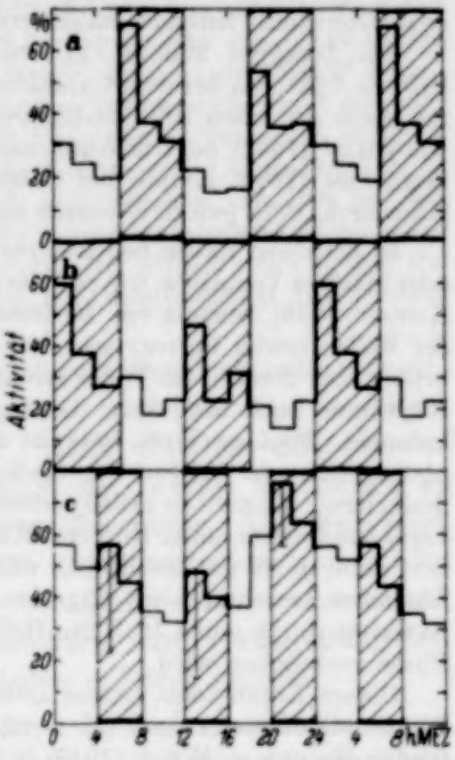

Abb. 15. a Aktivität im 6stündigen Phasenwechsel. Mittelwerte von 11 Einzelkurven (Januar 1959). b Ebenso; gegenüber a um 6 Std verschoben. Mittelwerte von 18 Einzelkurven (September/Oktober 1958). c Aktivität im 4stündigen Phasenwechsel. Mittelwerte von 15 Einzelkurven (Februar 1959). Zur Verdeutlichung des Ablaufes wurden die Aktivitätswerte zwischen 0—12 Uhr zweimal dargestellt

Die Aktivitätsrhythmik von Velien läßt sich also ebenso rasch auf andere, von normalen abweichende Hell-Dunkel-Rhythmen umstellen, wie ihre Orientierungsrhythmik (Birukow u. Busch 1957). Dort lag die Grenze wohl bei 5:5 Std, denn in diesem Rhythmus wechselten die Tiere nicht mehr zwischen Rechts- und Linkswinkeln ab. Ebenso verläuft auch der 4:4 Std-Aktivitätsrhythmus nicht mehr „diphasisch", d. h. mit Licht-aus- und Licht-an-Effekten, sondern „monophasisch", d. h. allein mit Dunkelmaxima. In allen Fällen tritt aber die Umstellung auf den neuen Rhythmus praktisch sofort ein und erlischt ebenso rasch unter konstanten Bedingungen. Dies spricht für eine direkte Wirkung des Außenfaktors, während die endogene Komponente hiervon unbeeinflußt bleibt; ihr Einfluß macht sich besonders bei kurzen Hell-Dunkel-Wechseln bemerkbar. Immerhin ist eine so starke Modulierbarkeit der Aktivitätsperiodik durch äußere Zeitgeber nicht allzu häufig.

Eine vorwiegend außenbedingte Rhythmik wird für Affen (Rhesus und Mantelpavian) angegeben (STSCHERBAKOWA 1954); die Umstellung auf 6:6 Std soll bei der Aktivität 3 Tage, bei der Körpertemperatur 3—8 Tage dauern. Bemerkenswert ist, daß auch die Rückumstellung auf Normalbedingungen bis zu 2 Tagen dauerte; der Außenfaktor muß also hier einen inneren Mechanismus nachhaltig verändert haben. Im übrigen scheint jedoch auch bei diesen Versuchen, wie aus den Kurven der Körpertemperatur hervorgeht, ein 24 Std-Rhythmus fortzubestehen, den der neue Rhythmus lediglich moduliert.

Für Insekten konnte CLOUDSLEY-THOMPSON (1956) einen starken Einfluß äußerer Faktoren bei dem Carabiden *Anthea venator* nachweisen, der seine Aktivität rasch an einen 9:9 Std-Rhythmus anpaßte; zum Teil erfolgreich war auch BROWMAN (1952) bei Umstimmungen von Ratten auf einen 8:8 Std-Rhythmus. SCHALLEK (1942) konnte bei *Cambarus* sogar einen 4:4 Std-Aktivitätsrhythmus induzieren, dem jedoch ebenfalls ein 24 Std-Rhythmus überlagert war.

In manchen Fällen beobachtete man bei den verkürzten Rhythmen abnormes oder inverses Verhalten, wie es *Velia* gelegentlich auch zeigte. Bei Tauben (SCHMIDT-KOENIG 1958) bewirkt ein 10:10stündiger Phasenwechsel nach 3 Tagen Umkehr der Rollen beider Partner während der periodischen Brutablösung; das Männchen brütet über Nacht, das Weibchen am Tage. Offenbar spielt auch hier der 24 Std-Rhythmus noch mit, denn die Anpassung an die neue Frequenz bleibt unvollkommen. *Euglena* (POHL 1948) ist normalerweise während des Tages am stärksten photopositiv; im 8:8 Std-Tag erscheint dieses Maximum stets kurz nach der Verdunkelung. KLEITMAN (1940) erhielt ebenfalls einen inversen Rhythmus, wenn er *Ligia baudiniana* einen 10:8 Std-Rhythmus bot: die Konzentration des Pigmentes tritt dann nicht wie gewöhnlich während der Dunkelheit, sondern zur Hellzeit ein. Ähnliches berichtet auch CLOUDSLEY-THOMPSON (1953) von *Periplaneta*, deren Aktivität durch einen 15:3 Std-Hell-Dunkel-Wechsel aus der Dunkel- in die Hell-Phase verschoben wird.

Diesen Ergebnissen stehen andere gegenüber, in denen der endogene 24 Std-Rhythmus dominiert und nur wenig durch äußere Einflüsse zu verändern ist. So fanden BROWN u. WEBB (1949) bei dem Farbwechsel von *Uca*, daß durch einen 6:6 Std-Phasenwechsel nur die Kontraktionsphase der Melanophoren um 6 Std verschoben und unter konstanten Bedingungen der alte Rhythmus rasch wiederhergestellt wird. Bei 16:16 Std zeigte sich ein Wechsel von rhythmischen und arrythmischen Pigmentbewegungen, je nachdem ob die künstlichen Hell-Dunkel-Zeiten mit den natürlichen übereinstimmten oder nicht (WEBB 1950). Völlig erfolglos waren Versuche mit gleicher Periodenlänge, die HEMPEL u. BREHM (1952) bei *Pterostichus* durchführten; hier wurde der alte Rhythmus anscheinend unbeirrt beibehalten, während *Carausius morosus* (KALMUS 1938) unter 8:8 und 14:14 Std-Rhythmen völlig arrhythmische Aktivität zeigte.

So läßt sich eine ganze Skala verschiedener Anpassungen zusammenstellen, deren Bereich auf der einen Seite durch die Dominanz der Außenfaktoren, auf der anderen durch die der inneren Periodik begrenzt wird.

Auf diese Zusammenhänge soll weiter unten näher eingegangen werden. *Velia* wäre einer Gruppe zuzuordnen, deren endogene Tagesperiodik zwar rasch und stark vom Zeitgeber Licht-Dunkel-Wechsel moduliert, jedoch nicht nachhaltig verformt wird. Eine stärkere Nachwirkung der aufgezwungenen Periodik ist bisher nur bei Affen, Brieftauben, der Alge *Hydrodictyon* (PIRSON u. Mitarb. 1954) und bei dem Pilz *Pilobolus* (ÜBELMESSER 1954) nachgewiesen worden. Zur entgegengesetzten Gruppe würde *Uca*, *Pterostichus* u. a. gehören, bei denen die endogene Komponente überwiegt. Zwischen diesen Extremen dürfte es viele Übergänge geben.

3. Die Aktivität in konstanten Lichtbedingungen

Die Versuche fanden in einer Temperaturkammer bei 15° C statt; sie war gegen Schall und Erschütterungen gut isoliert. Zum Auswechseln des Registrierpapierstreifens in den Dauerdunkel-Versuchen schaltete ich anfangs für kurze Zeit Rotlicht ein, arbeitete jedoch später in völliger Dunkelheit. In Versuchen bei Beleuchtungsintensitäten unter 0,5 lx wirkte nur das schwache Licht ein, das seitwärts aus der Versuchsapparatur drang und sich mit dem Luxmeter nicht mehr messen ließ. Die Beleuchtungsintensität von 0,5—1 lx lieferte eine 15 W-Birne, die das Versuchsgefäß indirekt anstrahlte. Bei 20 und 40 lx wurde dieselbe Lichtquelle direkt auf das Gefäß gerichtet und durch einen Schiebewiderstand geregelt, bei 700 lx brannte eine 100 W-Lampe. Bei den Dauerdunkel-Versuchen dichtete ich die Apparatur sorgfältig ab und lackierte außerdem meist die Augen der Velien, um den Einfluß des registrierenden Lichtstrahls auszuschalten. Da dies bei den *Dauerhell*-Versuchen natürlich unmöglich war, ist er dort als mögliche Fehlerquelle nicht auszuschließen. Exakt lassen sich daher nur die Dauerdunkel- gegen die Dauerhell-Versuche, nicht so gut dagegen jene mit verschiedenen Intensitäten gegeneinander sichern.

a) Dauerdunkel. Läßt man den Versuch mit dem normalen abendlichen Hell-Dunkel-Wechsel beginnen, so tritt zunächst das zu erwartende Abendmaximum der Aktivität auf. Nach etwa 12—15 Std, also zur Zeit des natürlichen Tagesbeginns, folgt ein zweites Maximum; es entspricht dem zweiten Gipfel des normalen Bigeminus. Abermals zeigt sich dabei, daß das Morgenmaximum nicht unmittelbar von einem Dunkel-Hell-Wechsel abhängt, obschon es häufig damit zusammenfällt; vielmehr steht es in bestimmter Beziehung zum vorangegangenen Abendmaximum; diese soll erst weiter unten erörtert werden.

Beginnt der Versuch morgens um 9 Uhr, d. h. nach einer Hellzeit von etwa 2—3 Std, so resultiert nach Verdunkelung und ebenso auch unter dem Einfluß der taktilen und mechanischen Reizung ein neues Hauptmaximum, dem nach ebenfalls 12—15 Std ein hohes Nebenmaximum folgt (Abb. 16a). Auch dies beweist die schnelle Umstimmbarkeit der Velienaktivität. Nur in wenigen Fällen setzt sich das tageszeitgemäße abendliche Maximum als Hauptmaximum durch.

Wie Abb. 16a weiterhin zeigt, folgen im Dauerdunkel dem ersten Hauptmaximum die weiteren Hauptmaxima im Abstand von ungefähr 24 Std; etwa ebenso groß ist der Abstand von einem Nebenmaximum zum nächsten. Im Mittel der Abstände von 24 Maxima erhält man 24,2 Std mit Extremwerten von 21 und 27 Std, die allerdings selten sind (Tabelle 1). Kleinere Abweichungen liegen außerhalb der Registrierungsgenauigkeit, zumal die Tiere selten länger als 5 Tage völlig ungestört bleiben konnten. So mögen kleinere Abweichungen von etwa $^1/_2$ Std ($\sigma_m = 0{,}5$ Std) bestehen, die sich innerhalb dieser 5 Tage nicht durchsetzen konnten. Diese endogene 24 Std-Periodik ließ sich bis zu 15 Tagen verfolgen (Abb. 17a), wobei die Tiere erst nach etwa 10 Tagen Dunkelhaft in die Versuchsapparatur gesetzt wurden.

Tabelle 1. *Mittlere Periodenlänge F der Aktivität in Dauerdunkel (0 lx) und Dauerhell bei verschiedenen Lichtintensitäten*

Gemessen wurde der Abstand zweier Hauptmaxima. n Zahl der addierten Perioden; σ_m einfacher mittlerer Fehler des Mittelwerts.

	0 lx	0,5 lx	0,5—1 lx	20 lx	40 lx	700 lx
F	$^1/_{24,2}$	$^1/_{26,2}$	$^1/_{27}$	$^1/_{26,1}$	$^1/_{26}$	$^1/_{27,5}$
n	24	18	3	9	8	3
σ_m	0,5	0,76				

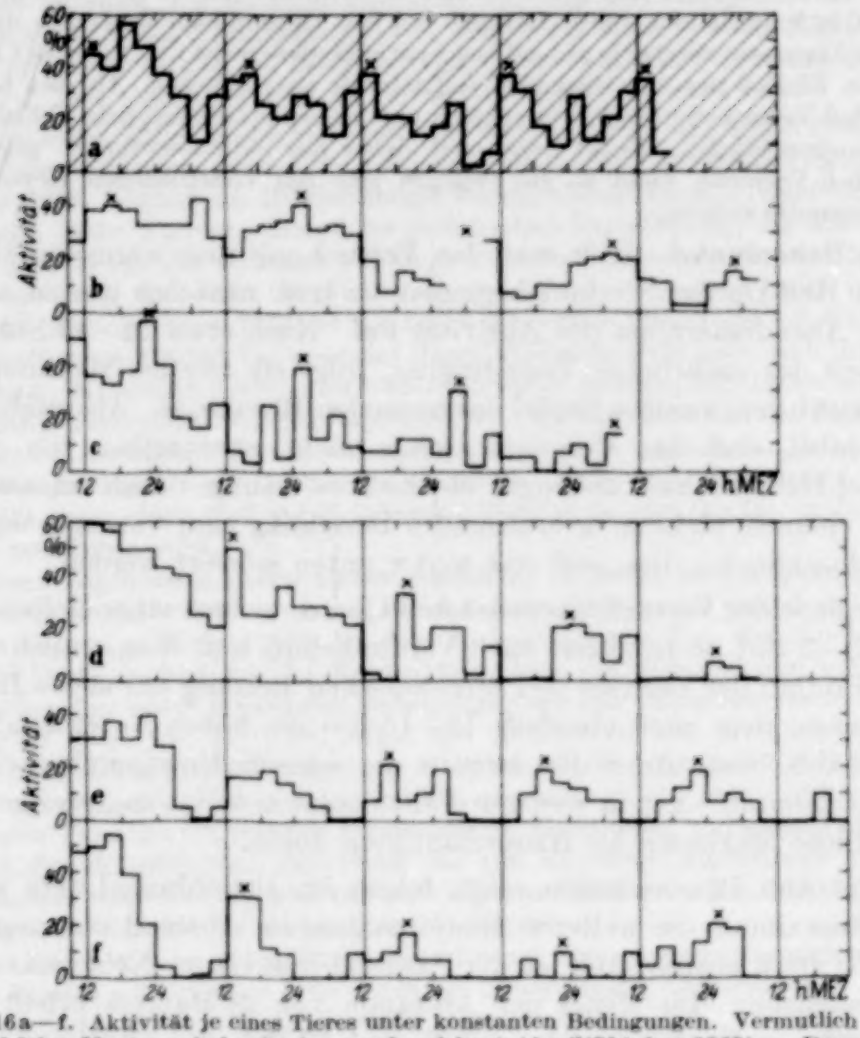

Abb. 16a—f. Aktivität je eines Tieres unter konstanten Bedingungen. Vermutlich zusammengehörige Maxima sind mit einem × bezeichnet (April/Oktober 1959). a Dauerdunkel 1.—5. Tag; b Dauerhell bei einer Grundintensität von 0,5 lx, 1.—5. Tag; c Dauerhell bei einer Grundintensität von 1 lx, 1.—4. Tag. d Dauerhell bei 20 lx, 1.—5. Tag. e Dauerhell bei 40 lx, 1.—6. Tag. f ebenso bei 700 lx, 1.—5. Tag

b) Dauerhell. Die Versuche begannen meist um 9 Uhr; auch hierbei konnte die taktile und mechanische Reizung ein so hohes Maximum induzieren, daß die Velien das Maximum der Aktivität zwischen 9 bis 12 Uhr als Hauptmaximum beibehielten. In der Zeit von 18—24 Uhr

kann dann ein weiteres Maximum folgen (Abb. 16e). Unter Dauerlichtbedingungen treten die Aktivitätsmaxima stets mit einem Intervall auf, das länger als 24 Std ist (Abb. 16b—f); bei allen untersuchten Lichtintensitäten von 0,5 lx bis zu 700 lx zeigte sich eine Periodenlänge von 26—27 Std (Tabelle 1). Die Mittelwerte liegen relativ eng beisammen und sind statistisch nicht gegeneinander zu sichern, was allerdings an der störenden Wirkung des registrierenden Lichtstrahls liegen mag. Gut gegeneinander gesichert ist dagegen die Periodenlänge von Dauerdunkel- und Dauerhell-Aktivität. Diese 27 Std-Perioden ließen sich

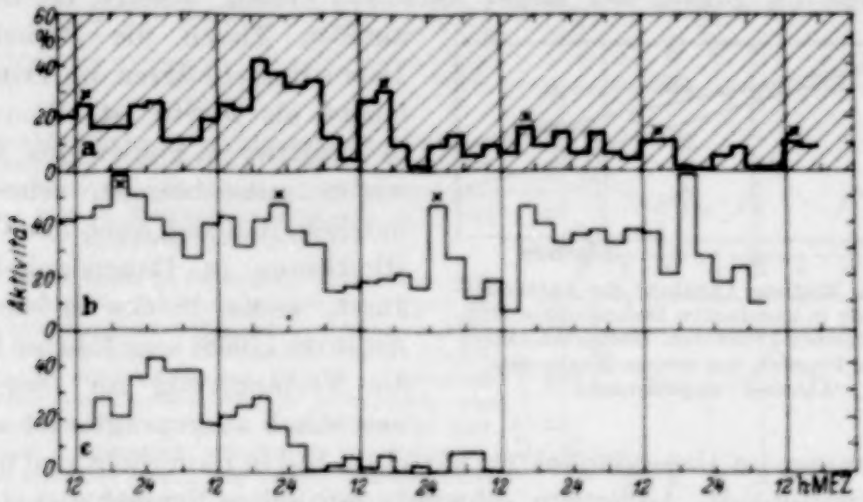

Abb. 17. a Dauerdunkel 11.—16. Tag. b Dauerhell bei einer Grundintensität von 0,5 lx, 8.—12. Tag. c Ebenso bei 0,5 lx, 26.—28. Tag

ebenfalls, wenigstens bei der niedrigsten Lichtintensität, bis zu 15 Tagen verfolgen (Abb. 17b); bei einigen Tieren allerdings konnte ich nach 2—3 Tagen oder bei Stichproben nach 3—4 Wochen Dauerlicht keinen oder nur einen sehr schwachen Rhythmus feststellen (Abb. 17c).

Es fällt auf, daß die Amplitude der Aktivität in Dauerdunkel und Dauerhell zu Beginn des Versuches stets am höchsten ist, dann aber im Verlauf von 3—6 Tagen auf Werte nahe der Null-Linie absinkt. Zuweilen beobachtet man nach diesem Minimum wieder ein leichtes Ansteigen der Aktivität. Diese Amplitudenverringerung läßt sich nicht allein auf die Verschmutzung der Wasseroberfläche zurückführen, obschon sich diese immer etwas störend bemerkbar machte. Teilt man nun die Höhe des ersten Aktivitätsmaximums durch die des vierten, so kann man den Quotienten als Maß der Amplitudenverringerung für diesen Zeitraum betrachten. Er beträgt im Mittel von 5 Dauerdunkel-Versuchen 2 und von 9 Dauerhell-Versuchen 3,7; im Dauerhell nimmt also die Aktivität rascher ab (Abb. 18). Lange Zeit in Dauerhell gehaltene Tiere zeigen nach anfänglich hoher Aktivität häufig eine schnelle Verringerung der Amplitude innerhalb von 2—3 Tagen (Abb. 17c).

Die Registriermethode erlaubt, wie schon erwähnt, leider keine ungestörte Aufzeichnung der Aktivität über längere Zeiträume; spätestens nach 6 Tagen muß das Wasser gewechselt werden. Dieser Eingriff kann ein neues Maximum induzieren und den vielleicht ausklingenden Aktivitätsrhythmus wieder zum Schwingen bringen. Als gesichert kann nur gelten, daß der Rhythmus während 6 Tagen Dauerdunkel bzw. Dauerhell mit etwa konstanter Frequenz weiterläuft; dasselbe läßt sich noch nach 14 Tagen und 3 Wochen nachweisen bzw. induzieren.

Die Ergebnisse der Dauerdunkel- und Dauerhell-Versuche entsprechen im ganzen der Regel ASCHOFFS (1958), wonach bei dunkelaktiven Tieren die Periode im Dauerdunkel kürzer, im Dauerhell länger als 24 Std ist. Wenn man den mittleren Fehler des Mittelwertes miteinbezieht, scheint es möglich, daß sich auch der Velien-Rhythmus in Dauerdunkel verkürzt, zumal in den meisten von ASCHOFF (1958) angeführten Fällen die Verlängerung im Dauerlicht wesentlich ausgeprägter ist als die Verkürzung im Dauerdunkel (im Mittel 1,2 Std in Dauerlicht und 0,5 Std in Dauerdunkel). Außerdem schwankt bei jedem Versuchstier die Periodenlänge auch unter gleichen Bedingungen (vgl. HOFFMANN 1960).

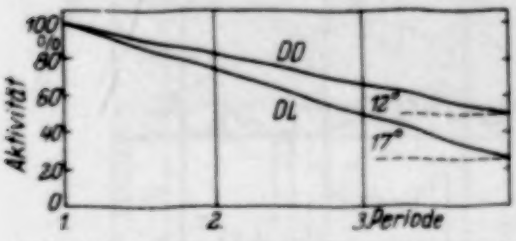

Abb. 18. Mittlere Abnahme der Aktivitätsamplitude in konstanten Bedingungen während der ersten 3 Perioden. Ordinate: Aktivität in Prozent des ersten Maximums. Abszisse: Periodenzahl

c) Aktivitätsperiodik nach Opticusdurchtrennung. Um den Einfluß der Sinneszellen, bzw. der optischen Ganglien auf den Verlauf des Aktivitätsrhythmus zu prüfen, durchschnitt ich in einer Versuchsserie den Tieren den Opticus auf beiden Seiten. Für solche Versuche eignet sich *Velia* besonders; ebenso wie bei Gerriden liegt hier das Protocerebrum nicht in der Kopfkapsel, sondern innerhalb der Brustsegmente; es ist mit dem Suboesophagialganglion und den 3 Thorakalganglien verschmolzen. Vom Protocerebrum ziehen die beiden Sehnerven nach vorn zu den Facettenaugen; nach Abschneiden des Kopfes werden nur die Augen, ihre Nerven und ein oder zwei optische Ganglien entfernt.

Da ich den Operationsschnitt an Versuchstieren nicht nachprüfen konnte, untersuchte ich parallele Schnittserien an ebenso operierten Tieren. Vor dem Eingriff kühlte ich die Tiere auf etwa 0° C ab, betäubte sie dann mit Äther und schnitt unter dem Binokular die Kopfkapsel ab. Sobald die ausgetretene Hämolymphe etwas eingetrocknet war, klebte ich darauf ein passendes Stückchen Deckglas mit einem Gel (Tyrocid X mit 2 Antibiotica) und befestigte es mit einem schnell trocknenden Kunstharz am Thorax — anderenfalls starben die Tiere durch Austrocknen innerhalb von 12 Std. Nach der Operation kamen sie wieder für 1 Std in den Eisschrank, dann für einige Zeit in einem feuchten Schälchen in die Versuchskammer. Nach 2—3 Std setzten normale Geh- und Schwimmbewegungen,

Umdrehreaktionen, Putzbewegungen usw. ein. Fünf der insgesamt 20 operierten Tiere lebten bis zu 60 Std nach der Operation und konnten zur Registrierung der Aktivität verwandt werden.

Die Mittelwertskurve (Abb. 19), bei der das erste auftretende Maximum als Null-Punkt der Zeitskala gilt, zeigt im ganzen eine 24 Std-Periodizität. Dem ersten Maximum folgt von 9—12 Uhr ein schwaches

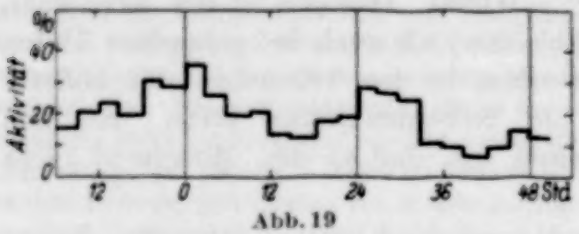

Abb. 19

Abb. 19. Aktivität nach Durchtrennung des Opticus. Mittelwerte von 5 Einzelkurven (November 1959). Ordinate: Aktivität in Prozent der höchstmöglichen; Abszisse: Zeit in Stunden bezogen auf das erste Maximum als Null-Zeit

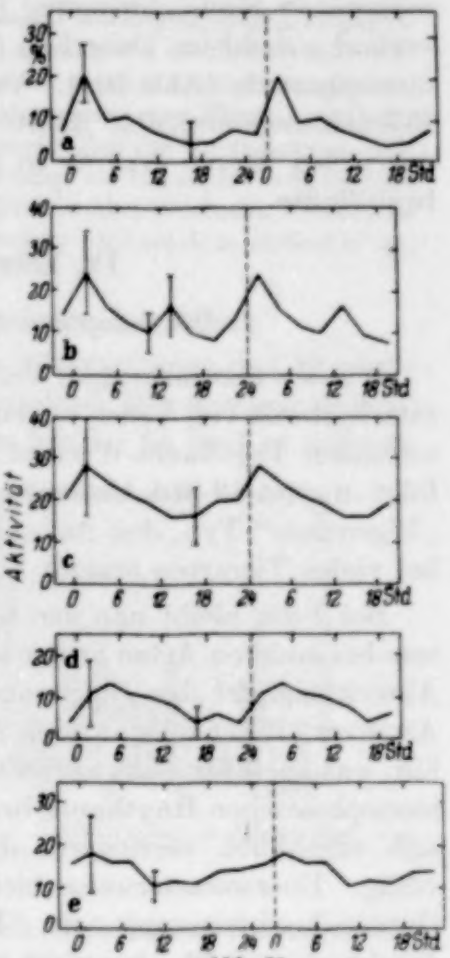

Abb. 20

Abb. 20. a Aktivität in Dauerhell. Mittelwerte von 18 Einzelperioden von einer Länge von 27 Std bei einer Beleuchtungsintensität von 1—700 lx. b Aktivität in Dauerdunkel. Mittelwerte von 18 Einzelperioden mit einer Länge von 24 Std. c Aktivität nach Durchtrennung des Opticus. Mittelwerte von 10 Einzelperioden mit einer Länge von 24 Std. d Aktivität in Dauerhell. Mittelwerte von 20 Einzelperioden mit einer Länge von 24 Std (gleiche Werte wie in 20a). e Aktivität in Dauerdunkel. Mittelwerte von 17 Einzelperioden mit einer Länge von 27 Std (gleiche Werte wie in Abb. 20b). Zur Verdeutlichung des Verlaufes wurden alle Werte zweimal hintereinander aufgezeichnet. Ordinate: Aktivität in Prozent; Abszisse: Zeit in Stunden bezogen auf das erste Maximum als Null-Zeit

Nebenmaximum, das von 2 Einzelkurven stammt, die ein solches erkennen ließen. Der Aktivitätsverlauf ist vorwiegend monophasisch, was sich auch in einer weiteren Mittelwertskurve (Abb. 20c) zeigt.

Vergleicht man alle Ergebnisse in Dauerdunkel und Dauerhell von 1 lx an aufwärts miteinander, indem man alle Einzelperioden addiert und mittelt, so ergibt sich folgendes: zunächst läßt sich abermals der Unterschied in der Periodenlänge sichern. Mittelt man die Dauerdunkel-Versuche durch Addition von 24 Std-Perioden, so erhält man ausgeprägte Maxima und Minima, deren Werte außerhalb des 3fachen mittleren Fehlers σ_m liegen (Abb. 20b). Addiert man dagegen die 27 Std-Perioden, so lassen sich die Maxima und Minima nicht gegeneinander sichern (Abb. 20e). Für die Dauerhell-Versuche gilt aber das Umgekehrte: hier sind nur die Werte bei der Addition von 27 Std-Perioden statistisch

gesichert (Abb. 20a und 21d). Weiterhin zeigt sich, daß nur im Dauerdunkel ein Nebenmaximum etwa 12—15 Std nach dem Hauptmaximum auftritt (Abb. 20b).

Gegen die Annahme eines monophasischen, sinusförmigen Verlaufs der Aktivitätskurve ist das Nebenmaximum an dieser Stelle statistisch gut gesichert: sein 3facher mittlerer Fehler liegt außerhalb einer angenommenen Sinusschwingung ($P = 0{,}008$). Dagegen ist der Aktivitätsverlauf sowohl im Dauerhell (Abb. 20a) als auch bei geköpften Tieren monophasisch (Abb. 20c). Vor allem in den Versuchen mit höherer Beleuchtungsintensität fehlte ein Nebenmaximum stets. Bei den operierten Tieren trat es so selten auf, daß es den Mittelwert nicht beeinflußte.

IV. Erörterung der Befunde

1. Die endogenen Anteile der Aktivitätsperiodik

Wie aus den bisherigen Versuchen hervorgeht, liegt auch der Aktivitätsrhythmik von Velien ein endogener 24 Std-Rhythmus zugrunde. Im normalen Tag-Nacht-Wechsel ist er diphasisch; dem Hauptmaximum folgt in etwa 12 Std Abstand ein Nebenmaximum. Dies entspricht dem „Bigeminus"-Typ, den ASCHOFF (1957) als Grundmuster der Aktivität bei vielen Tierarten ansieht.

Bei *Velia* bleibt nun der Bigeminus auch in Dauerdunkel bestehen, was bei anderen Arten bisher selten beschrieben worden ist. Die beiden Aktivitätsgipfel des Bigeminus sind jedoch nicht gleichwertig; schon ASCHOFF (1957) wies auf den labileren Charakter des Nebenmaximums hin, was auch für *Velia* zutrifft: in Dauerhell bleibt nämlich ein stabiler monophasischer Rhythmus bestehen, dessen Frequenz und Amplitude sich allmählich verringern; das Nebenmaximum verschwindet dabei völlig. Unerwarteterweise bleibt das Nebenmaximum auch nach der Opticusdurchtrennung aus. Der Aktivitätsrhythmus nach Opticusdurchtrennung ist also nicht ohne weiteres mit demjenigen in Dauerdunkel zu vergleichen. Wenn andererseits auch Dauerlicht das Nebenmaximum unterdrückt, so wäre vielleicht an eine hemmende Wirkung der optischen Ganglien im Licht zu denken; umgekehrt müßten sie den zweiten Gipfel im Dunkeln fördern, denn nach ihrer Ausschaltung bleibt er auch in Dauerdunkel aus. Die wenigen Fälle, wo das Nebenmaximum auch bei operierten Tieren auftrat, sind vermutlich auf unvollständige Ausschaltung der verantwortlichen zentralnervösen Strukturen zurückzuführen. Zur Klärung ihrer Einflüsse sind weitere Versuche abzuwarten. Ähnlich hemmend scheinen auch tiefe Temperaturen zu wirken; bei 5° C (vgl. Abb. 7) stieg die Aktivität im normalen Tag-Nacht-Wechsel während der Nacht nicht nochmals an. Der monophasische

24 Std-Rhythmus dürfte jedenfalls der stabilere sein, er scheint einen zweiten rhythmischen Prozeß zu steuern, der weit stärker als der erste von Außenfaktoren abhängt.

Die Bigeminusform eines endogenen Rhythmus läßt sich mit den neueren Modellvorstellungen über die Oszillatoreigenschaften der endogenen Rhythmen (Bethe 1941; Pittendrigh 1957; Bünning 1958; Pittendrigh u. Bruce 1959) in Einklang bringen, wenn man einige zusätzliche Regelmechanismen, die der Abhängigkeit des Nebenmaximums vom Hauptmaximum Rechnung tragen, einführt. Bei *Velia* kommt noch hinzu, daß die höchste Spannung des Oszillators nicht inmitten einer der beiden Phasen, sondern unmittelbar an den Lichtphasengrenzen erreicht wird. Der Außenreiz führt die in der vorhergegangenen Phase begonnene Spannung rasch zu Ende und bewirkt innerhalb kurzer Zeit die Entspannung. Die „Eigenfrequenz" (Kalmus 1938) ist jedoch 24stündig; sie behauptet sich in konstanten Bedingungen ebenso wie in sehr kurzen Hell-Dunkel-Wechseln, obwohl sie innerhalb bestimmter Grenzen durch den Außenfaktor sehr stark modulierbar ist.

2. Untereinheiten der Aktivität und ihre Integration

Physiologisch betrachtet ist jeder Aktivitätsrhythmus das Ergebnis einer Summation und Integration von einzelnen Bewegungsimpulsen, bis zu den Aktionen einzelner Motoneurone herab. So liegt es nahe zu

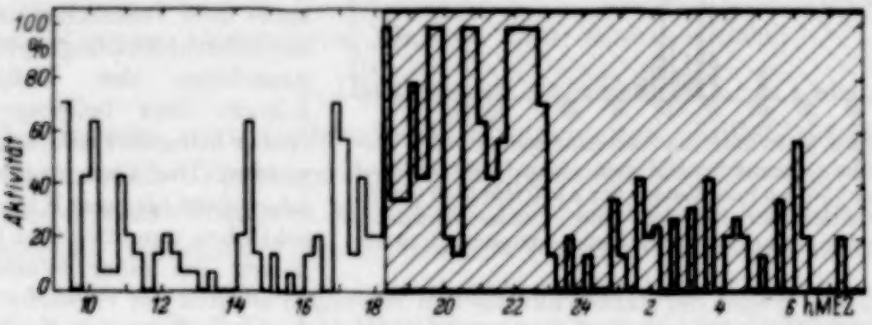

Abb. 21. Aktivitätsmuster im 9:15 Std-Kunsttag bei Registrierung in Abständen von 15 min (20./21. 11. 59)

fragen, aus welchen räumlich und zeitlich definierten funktionellen Untereinheiten sich die lokomotorische Aktivität der Velien aufbaut.

Verändert man das Zeitraster der Registrierung, indem man die Umdrehungsgeschwindigkeit der Registriertrommel erhöht und bei der Auswertung entsprechend kleinere Zeiteinheiten wählt, so ergibt sich naturgemäß ein anderes Aktivitätsmuster. Jeweils über 15 min zusammengefaßt, zerfällt der 24 Std-Rhythmus in viele kleine Maxima und Minima von verschiedener Dauer (Abb. 21). Die Schubfolgen der Aktivität sind verschieden lang und von verschiedener Frequenz. Beide Größen variieren anscheinend während 24 Std gemeinsam; in der ersten Nachthälfte sind die Aktivitätsschübe länger und folgen schneller aufeinander als in der zweiten Hälfte und während des Tages (Tabelle 2).

Tabelle 2. *Durchschnittliche Länge der Aktivitätszeit $\overline{A}$ und der Ruhezeit $\overline{R}$ von Versuch Abb. 21*

	1. Nachthälfte	2. Nachthälfte	Tag
$\overline{A}$	15 min	4 min	6 min
$\overline{R}$	12,3 min	20,5 min	21,8 min

Die einzelnen Werte für Dauer und Frequenz der Schübe schwanken sehr stark je nach äußeren und inneren Bedingungen; eine allgemeine Regel läßt sich hier nicht aufstellen. Kürzere Rhythmen von etwa 2 Std Dauer, wie sie ASCHOFF (1957) für einige Mäusearten beschrieb, konnte ich nicht beobachten. Auch dort folgten die Schübe in den Dunkelstunden dichter und mit längerer Zeitdauer aufeinander als in den Lichtstunden.

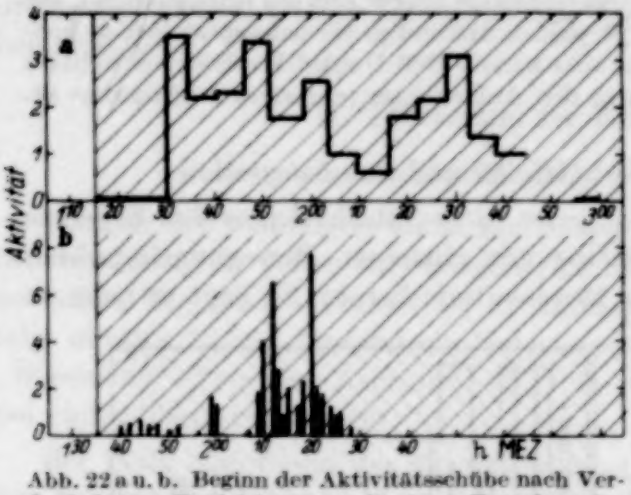

Abb. 22 a u. b. Beginn der Aktivitätsschübe nach Verdunkelung; Registrierung mit einem Tarachometer (Oktober 1958). a Summation der Aktivität über 5 min; b Summation der Aktivität über 1 min. Ordinate: Aktivität in willkürlichen Einheiten; Abszisse: Uhrzeit

Genauer ließen sich die einzelnen Aktivitätsschübe mit einer Registriermethodik auflösen, die von CORTI, WEBER u.a. (1950ff.) entwickelt wurde[1]. Dabei mißt man feinste Schwingungen mit Hilfe einer Tauchspule über Verstärker und Kathodenstrahloszillograph; die Ausschläge des Meßgerätes können über beliebige Zeiträume integriert und abgelesen werden. Die Tiere untersuchte ich einzeln in einem Kunststoffschälchen von etwa 4 cm Durchmesser bei einer Wasserhöhe von 0,5 cm. Wegen der starken akustischen Störungen mußten die Versuche nachts laufen; die Beleuchtung wurde gegen 1 Uhr ausgeschaltet und danach der Verlauf der Schwingungen auf dem Oszillographenschirm beobachtet und während 5 oder 1 min registriert.

Abb. 22 a, b zeigt, daß die Aktivitätsschübe von 15—30 min Dauer der Kurve Abb. 21 sich in noch kleinere Schübe von 3—4 min Dauer aufteilen lassen. Als kleinste Aktivitätszeichen erkennt man auf dem Oscillographenschirm kurze Schwingungen von einigen Sekunden Dauer. Diese Befunde zeigten außerdem, daß die Aktivität nicht unmittelbar nach dem Verdunkeln einsetzt, sondern erst nach einer längeren Latenzzeit von einigen Minuten. Dies beweist, daß man den „Aus-Effekt" nicht etwa mit dem „Schattenreflex" vieler Tiere vergleichen kann.

Die kleinsten lokomotorischen Einheiten, bei Velien mehrere Ruderbewegungen des mittleren Beinpaares von einigen Sekunden Dauer, folgen je nach dem zentralen Erregungsniveau in kürzeren oder längeren

[1] Für die Überlassung des Gerätes für die Dauer meiner Versuche sei hier Herrn Dr. CORTI und Herrn DIETIKER, Zürich, gedankt.

Abständen aufeinander. Diese kleinsten Schübe kann man wieder zu einer Gruppe von einigen Minuten Dauer zusammenfassen; die nächste folgt nach einem längeren Intervall. Durch weitere Zusammenfassung erhält man Aktivitätsschübe von $^1/_4$ Std und länger; doch sind die Pausen zwischen den einzelnen Untereinheiten keineswegs gleich lang. Man gewinnt den Eindruck, daß es sich bei den motorischen Zentren um unselbständige Systeme handelt, die von einem dominanten Rhythmus „angestoßen" werden (Bethe 1941). Über den Mechanismus dieser Koordination läßt sich vorerst wenig aussagen; man könnte z. B. eine salvenartige Antwort der motorischen Zentren auf rhythmische Impulse des Zentralnervensystems nach Art der v. Holstschen Automatismen annehmen (v. Holst 1938).

Da das Zentralnervensystem der Arthropoden zweifellos an ihrer endogenen Rhythmik beteiligt ist (Harker 1958 u. a.), könnte ein zentralnervöser automatischer Rhythmus Ursache des lokomotorischen sein. Nach Jahn (1940), Wolff und Jahn (1943) scheinen solche endogenen zentralen Rhythmen im Gehirn von Insekten auch die Afferenzen der Lichtrezeptoren zu beeinflussen; das ERG verschiedener Käfer verändert sich rhythmisch am Tage und in der Nacht. Ein gemeinsamer automatischer „Grundrhythmus" könnte auf diese Weise efferente und afferente Regelsysteme modulieren; so bestehen offenbar auch zwischen dem Aktivitätszustand und der Orientierungsweise von Insekten gesetzmäßige Beziehungen (Rensing, Oberdorfer, Birukow 1959; Birukow 1960).

3. Die exogenen Anteile

Hemmende und fördernde Wirkungen von Außenfaktoren auf autorhythmische Vorgänge sind bei biologischen Rhythmen (z. B. Hirnrhythmen nach Adrian u. Matthews 1934) ebenso wie bei physikalisch-chemischen Modellen (Bethe 1948 u. a.) bekannt. Unsere Befunde an *Velia* zeigen eindeutig, daß ihre lokomotorische Aktivität sich in kürzester Zeit neuen Hell-Dunkel-Rhythmen von verschiedener Frequenz und Phasenlage anpassen kann. Dabei setzt das Licht offenbar eine Hemmung in Gang, ähnlich wie bei den Hirnrhythmen von Insekten und den α-Wellen beim Menschen (Adrian u. Matthews 1934). Dunkelheit wirkt bei Velien entgegengesetzt; durch diesen Antagonismus kann der endogene Rhythmus in Grenzen jederzeit durch den Hell-Dunkel-Wechsel „verformt" werden. Die Wirkung des Außenfaktors hängt jedoch mit davon ab, in welcher Phase des endogenen Rhythmus er einwirkt; bei niedriger endogener Aktivität wirkt z. B. Verdunkelung weniger stark und nachhaltig als bei hoher (vgl. Abb. 14). In sehr raschen Hell-Dunkel-Wechseln (4:4 Std, Abb. 15c) zeigen sich die Grenzen der Außenbedingtheit: der endogene 24 Std-Rhythmus macht sich vom Außenfaktor mehr und mehr unabhängig (vgl. auch Schallek 1942).

Gelegentlich beobachtet man aber auch eine „Licht-an-Reaktion", d. h. eine kleine Aktivitätserhöhung beim Übergang zur Hellphase. Bei

näherer Betrachtung zeigt sich, daß diese Aktivitätssteigerung vor allem nach längeren Dunkelzeiten eintritt. Rechnet man als „Licht-an-Reaktion" einen Aktivitätsanstieg um das 1,5fache des letzten Dunkelwertes, so tritt sie in verschiedenen Hell-Dunkel-Wechseln in folgender prozentualer Häufigkeit auf: bei 4:4 Std 21%, 6:6 Std 16%, 8:8 Std 36%, 12:12 Std 43% und 9:15 Std 75%. Diese Abhängigkeit von der Länge der Dunkelphase läßt vermuten, daß ein Lichtreiz erst dann wirksam werden kann, wenn eine genügend lange Dunkelzeit vorangegangen war. Diese Beziehungen bedürfen jedoch noch näherer Analyse.

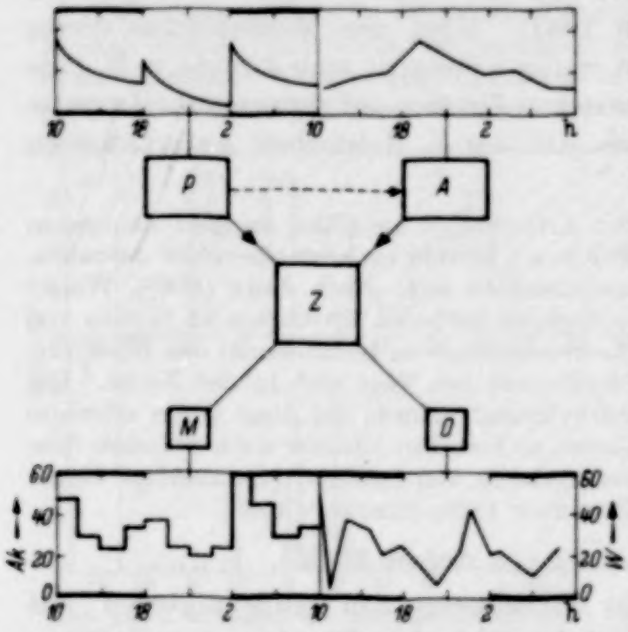

Abb. 23. Theoretisches Funktionsschema für den Zusammenhang zwischen peripheren Einwirkungen und endogenem Rhythmus. *A* endogener Rhythmus (Automatismus) in Dauerdunkel; *P* periphere Hell-Dunkel-Reize und ihre mutmaßliche hemmende bzw. enthemmende Einwirkung auf den endogenen Rhythmus *A*; *Z* koordinierende Zentren; *M* motorische Unterzentren; *O* Orientierungszentren. Der untere Teil des Schemas stellt den resultierenden Verlauf der Aktivitätsrhythmik (*Ak*) und die rhythmischen Änderungen des Orientierungswinkels (*W*) im 8stündigen Phasenwechsel dar

Sowohl der Licht-an- als auch der Licht-aus-Effekt klingen mehr oder weniger schnell ab; hier sind wahrscheinlich Adaptationsvorgänge beteiligt, die sich noch nicht näher lokalisieren lassen. Auch Intensitätsverminderungen sind wirksam; zuerst wird die innere Schwelle für die Motorik offenbar gesenkt, danach steigt sie allmählich wieder an. Ähnlich ist auch die Wirkung relativer Lichtintensitäten bei *Velia* zu verstehen. Der Effekt eines Helligkeitsunterschiedes hängt wohl vor allem vom Adaptationszustand ab. Insgesamt macht die Aktivitätsperiodik der Velien das Zusammenwirken endogener und exogener Faktoren besonders anschaulich. — So lassen sich die bisherigen Befunde zu einem theoretischen Schema vereinigen (Abb. 23), in dem die bisher bekannten Faktoren wie folgt zusammenwirken. Der Automatismus (*A*), der hier den endogenen Rhythmus veranschaulicht, ist für die Erregungsbildung verantwortlich, deren Entladungsfrequenz während 24 Std in Form eines „Bigeminus" periodisch schwankt. Er wird durch periphere Hell-Dunkel-Reize (*P*) gehemmt oder enthemmt; im Schema sind diese Wirkungen für einen 8stündigen Phasenwechsel dargestellt. Licht-Dunkel-Wechsel haben die stärkste enthemmende, längere Lichtphasen

die stärkste hemmende Wirkung. Aus dem Zusammenwirken von *A* und *P* entsteht das Muster der Aktivitäts(*M*)- und Orientierungsrhythmik (*O*) im 8stündigen Phasenwechsel (vgl. Birukow und Busch 1957). Die Beziehungen zwischen der Aktivitätsperiodik und den rhythmischen Änderungen des Orientierungswinkels der Velien (vgl. Rensing, Oberdorfer, Birukow 1959; Birukow 1960) sind jedoch zur Zeit noch Gegenstand laufender Untersuchungen.

Zusammenfassung

1. Der Wasserläufer *Velia currens* F. ist nachtaktiv und zeigt abends ein Haupt-, morgens ein Nebenmaximum der Aktivität nach Art eines „Bigeminus"; ersteres erscheint immer zu Beginn einer Dunkelphase eines 24stündigen Hell-Dunkel-Wechsels. Larven des 2.—4. Stadiums verhalten sich ebenso; ihre Tagesaktivität ist jedoch höher.

2. Erhöhung der Temperatur bis auf 25—30° C bewirkt in einem 15:9 Std-Kunsttag eine relative Aktivitätssteigerung vor allem um Mittag und Mitternacht, doch bleibt der Einfluß des Zeitgebers weiterhin erkennbar.

3. In der Temperaturorgel erweist sich *Velia* als stenotherm kälteliebend, mit einem Vorzugsbereich von 4—16° C, während *Gerris lacustris* L. in einem Bereich von 12—31° C eurytherm ist. Die Aktivität von *Gerris lacustris* L., *G. gibbifera* Schum. und *G. najas* de Geer wird durch den Hell-Dunkel-Wechsel weniger als bei Velien beeinflußt.

4. Verminderung der Lichtintensität und nachfolgende Verdunkelung lösen jedesmal Aktivitätsschübe aus. Der Tag-Nacht-Rhythmus der Aktivität wird durch relative Intensitätsunterschiede gesteuert.

5. An einen inversen Tag-Nacht-Rhythmus passen sich Velien binnen etwa 52 Std an; ihre Aktivität läßt sich leicht durch künstliche Hell-Dunkel-Rhythmen von 16:16, 8:8, 6:6 und 4:4 Std Dauer modulieren, doch bleibt daneben der Einfluß eines endogenen 24 Std-Rhythmus erkennbar.

6. In Dauerdunkel bleibt der Aktivitätsrhythmus bis zu 15 Tagen mit einer Periodendauer von etwa 24 Std bestehen; in Dauerhell bei verschiedenen Lichtintensitäten beträgt die Periodendauer 26—27 Std. Die Amplitude der Aktivität nimmt während des Aufenthaltes in Dauerdunkel und Dauerhell laufend ab, in Dauerhell besonders stark.

7. Der Bigeminus bleibt auch in Dauerdunkel bestehen, in Dauerhell entfällt dagegen sein Nebengipfel. Nach Blendung durch Opticusschnitt ändert sich der Verlauf der Aktivität ebenso: nur der Hauptgipfel bleibt erhalten.

8. Die Velienrhythmik wird durch endogene und exogene Faktoren reguliert, deren Wirkung an Hand einiger Modellvorstellungen diskutiert und mit der Orientierungsrhythmik verglichen wird.

Literatur

ADRIAN, E. D., and B. H. C. MATTHEWS: The Berger rhythm. Potential changes from the occipal lobes in man. Brain **57**, 356 (1934).

ASCHOFF, J.: Die 24-Stunden-Periodik der Maus unter konstanten Umgebungsbedingungen. Naturwissenschaften **38**, 506 (1951).

— Zeitgeber der tierischen Tagesperiodik. Naturwissenschaften **41**, 49 (1954).

— Aktivitätsmuster der Tagesperiodik. Naturwissenschaften **44**, 361 (1957).

— Tierische Periodik unter dem Einfluß von Zeitgebern. Z. Tierpsychol. **15**, 1 (1958).

BELING, I.: Über das Zeitgedächtnis der Bienen. Z. vergl. Physiol. **9**, 259 (1941).

BETHE, A.: Die biologischen Rhythmusphänomene als selbständige bzw. erzwungene Kippvorgänge betrachtet. Pflügers Arch. ges. Physiol. **244** (1941).

— Beobachtungen über die Bredigsche rhythmische Katalyse des Wasserstoffperoxyds an einer Quecksilberoberfläche. Z. Naturforsch. **3b**, 69 (1948).

BIRUKOW, G.: Photogeomenotaxis bei *Geotrupes silvaticus* PANZ. und ihre zentralnervöse Koordination. Z. vergl. Physiol. **36**, 176 (1954).

— Lichtkompaßorientierung beim Wasserläufer *Velia currens* F. am Tage und zur Nachtzeit. I. Herbst- und Winterversuche. Z. Tierpsychol. **13**, 463 (1956).

— Innate types of chronometry in insect-orientation. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. (1960, im Druck).

—, u. E. BUSCH: Lichtkompaßorientierung beim Wasserläufer *Velia currens* F. (Heteroptera) am Tage und zur Nachtzeit. II. Orientierungsrhythmik in verschiedenen Lichtbedingungen. Z. Tierpsychol. **14**, 184 (1957).

—, u. H. OBERDORFER: Schwerkraftorientierung beim Wasserläufer *Velia currens* F. (Heteroptera) am Tage und zur Nachtzeit. Z. Tierpsychol. **16**, 693 (1959).

BOLLWEG, G.: Beiträge zur Faunistik und Ökologie der aquatilen Rhynchoten usw. Verh. naturhist. Ver. Rheinland u. Westf. **71** (1914).

BROWMAN, L.: Artificial sixteen-hour-day activity rhythm in the white rat. Amer. J. Physiol. **168**, 694 (1952).

BROWN, F. A., and H. M. WEBB: Studies of the daily rhythmicity in the fiddler crab, *Uca*. Modifications by light. Physiol. Zool. **22**, 136 (1949).

BÜNNING, E.: Zur Kenntnis der endonomen Tagesrhythmik bei Tieren und Pflanzen. Ber. dtsch. bot. Ges. **53**, 594 (1935).

— Die physiologische Uhr. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1958.

CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L.: LXIX. Studies in diurnal rhythms. Ann. Mag. Nat. Hist., XII. ser. **6**, 705 (1953).

— XXXIII. Studies in diurnal rhythms. Ann. Mag. Nat. Hist., XII. ser. **9**, 305 (1956).

CORTI, U. A., F. GASSMANN u. M. WEBER: Unruhebestimmung bei Menschen und Tieren. Verh. schweiz. Naturforsch. Ges. **164** (1955).

EIDMANN, H.: Über rhythmische Erscheinungen bei der Stabheuschrecke *Carausius morosus* BR. Z. vergl. Physiol. **38**, 370 (1955).

EMEIS, D.: Untersuchungen zur Lichtkompaßorientierung des Wasserläufers *Velia currens* F. Z. Tierpsychol. **16**, 129 (1959).

FALLEN, C.: Hemiptera Sveciae. Londine Gothorum 1826—1829.

FRISCH, K. v.: Orientierungsvermögen und Sprache der Bienen. Naturwissenschaften **38**, 105 (1951).

—, u. M. LINDAUER: Himmel und Erde in Konkurrenz bei der Orientierung der Bienen. Naturwissenschaften **41**, 245 (1954).

HARKER, E. J.: Diurnal rhythms in the animal kingdom. Biol. Rev. **33**, 1 (1958).

HEMPEL, G., u. E. BREHM: Untersuchungen tagesperiodischer Aktivitätsschwankungen bei Käfern. Naturwissenschaften **39**, 265 (1952).

Henke, K.: Die Lichtorientierung und die Bedingungen der Lichtstimmung bei der Rollassel *Armadillidium cinereum* Zenker. Z. vergl. Physiol. **13**, 534 (1930).
Herter, K.: Untersuchungen über den Temperatursinn einiger Insekten. Z. vergl. Physiol. **1**, 221 (1924).
Hoffmann, K.: Versuche zu der im Richtungsfinden der Vögel enthaltenen Zeiteinschätzung. Z. Tierpsychol. **11**, 453 (1954).
— Versuche zur Analyse der Tagesperiodik. I. Der Einfluß der Lichtintensität. Z. vergl. Physiol. **43**, 544 (1960).
Holst, E. v.: Zentralnervensystem. Fortschr. Zool. **4**, 472 (1938).
— Entwurf eines Systems der lokomotorischen Periodenbildung bei Fischen. Z. vergl. Physiol. **26**, 481 (1939).
—, u. H. Mittelstaed: Das Reafferenzprinzip. Naturwissenschaften **37**, 464 (1950).
Jahn, T. L.: Diurnal changes in the electric response of the compound eye. Biol. Bull. **78** (1940).
Kalmus, H.: Über die Natur des Zeitgedächtnisses bei Bienen. Z. vergl. Physiol. **20**, 405 (1934).
— Über das Problem der sog. exogenen, endogenen, sowie der erblichen Rhythmik und über organische Periodizität überhaupt. Riv. Biol. **24**, 191 (1938).
— Tagesperiodisch verlaufende Vorgänge an der Stabheuschrecke (*Dixippus morosus*) und ihre experimentelle Beeinflussung. Z. vergl. Physiol. **25**, 494 (1938).
Pätau, K.: Zur statistischen Beurteilung von Messungsreihen (eine neue t-Tafel). Biol. Zbl. **63**, 152 (1943).
Papi, F., e L. Pardi: Richerche sull'orientamento di *Talitrus saltator* (Montagu). II. Sue fattori che regolano la variazione dell' angolo di orientamento nel corso del giorno. L'orientamento di notte, l'orientamento diurno di altre popolazioni. Z. vergl. Physiol. **35**, 490 (1953).
Park, O.: Nocturnalism — the development of a problem. Ecolog. Monogr. **10** (1940).
—, and J. G. Keller: Studies in nocturnal ecology. II. Analysis of activity rhythms in nocturnal forest insects. Ecology **13**, 335 (1932).
— J. A. Lockett and D. J. Myers: Studies in nocturnal ecology with special reference to climax forst. Ecology **12**, 709 (1931).
Pirson, A., W. J. Schön u. H. Döring: Wachstums- und Stoffwechselperiodik bei *Hydrodictyon*. Z. Naturforsch. **9**b, 349 (1954).
Pittendrigh, C. S., and V. G. Bruce: An oscillator model for biological clocks. Rhythmic and synthetic processes in growth. Princeton: University Press 1957.
— — Daily rhythms as coupled oscillator systems and their relation to thermoperiodism and photoperiodism. Photoperiodism and related phenomena in plants and animals. Amer. Ass. Advancement of Science Washington 1959.
Pohl, R.: Tagesrhythmus im phototaktischen Verhalten der *Euglena gracilis*. Z. Naturforsch. **3**b, 367 (1948).
Rawson, K.: Sun compass orientation and endogenous activity rhythms of the starling. Z. Tierpsychol. **11**, 446 (1954).
Renner, M.: Der Zeitsinn der Arthropoden. Ergebn. Biol. **20** (1958).
Rensing, L., H. Oberdorfer u. G. Birukow: Orientierungsrhythmik und tagesperiodische Aktivität beim Wasserläufer *Velia currens* F. Naturwissenschaften **46** (1959).
Roeder, K. D.: Spontaneous activity and behavior. Sci. Monthly **80**, 362 (1955).
Schallek, W.: Some mechanisms controlling locomotor activity in the crayfish. J. exp. Zool. **91**, 155 (1942).
Schmidt-Koenig, K.: Experimentelle Einflußnahme auf die 24-Std-Periodik bei Brieftauben und deren Auswirkungen unter besonderer Berücksichtigung des Heimfindevermögens. Z. Tierpsychol. **15**, 301 (1958).

Steiniger, F.: Die Erscheinungen der Katalepsie bei Stabheuschrecken und Wasserläufern. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **26**, 591 (1933).

Stscherbakowa, O. P.: Experimentelle Untersuchungen über den 24-Std Rhythmus physiologischer Funktionen bei Affen. Studien über periodische Veränderung physiologischer Funktionen des Organismus, S. 40. Berlin: Akademie-Verlag 1954.

Wahl, O.: Neue Untersuchungen über das Zeitgedächtnis der Bienen. Z. vergl. Physiol. **16**, 529 (1932).

Webb, M.: Diurnal variations of response to light in the fiddler crab *Uca*. Physiologic Zool. **23**, 316 (1950).

Wesenberg-Lund, C.: Insektlivet i ferske Vande. Kopenhagen 1915.

Weyrauch, W.: Untersuchungen und Gedanken zur Lichtorientierung von Arthropoden. Zool. Jb., Abt. allg. Zool. u. Physiol. **47**, 291 (1930).

Wulff, V. J., and T. L. Jahn: Intensity-EMF-relationship of the ERG of beetles possessing a visual diurnal rhythm. J. cell. comp. Physiol. **22** (1943).

Dr. L. Rensing,
Zoologisches Institut der Universität Göttingen, Berliner Straße 28

Zeitschrift für vergleichende Physiologie 44, 323—330 (1961)

Zoological Laboratory, Department of Endocrinology, University of Utrecht, The Netherlands

A MELANOCYTE-STIMULATING SUBSTANCE IN THE SKIN SECRETION OF *XENOPUS LAEVIS*

By

F. C. G. VAN DE VEERDONK, J. W. HUISMANS and A. D. F. ADDINK

With 3 Figures in the Text

(Received October 10, 1960)

Introduction

In a series of investigations, carried out in this laboratory (BURGERS 1956), it was shown that the pigment granules of the melanocytes in the skin of the South African clawed toad, *Xenopus laevis*, are stimulated by a number of substances. In these *in vitro* investigations excised webs of *Xenopus* were used as a test object. Dispersion of the concentrated granules in light-adapted animals was caused by some polypeptides, as well as by several other molecules, each of these two groups producing a typical pattern in the *in vitro* assay. Using a solution of intermedine (MSH) or corticotropin (ACTH), a melanocyte pattern as shown in Fig. 1b, was obtained (BURGERS & MIGHORST 1957). Maximal dispersion occurred along the cut edges and blood vessels of the web. Fig. 1c represents a second type of dispersion in which the centre of the web also shows dispersion of the melanocytes. This type of darkening results after immersion of the excised webs in a solution of various catecholamines (BURGERS 1957), of a pregnancy urine extract (BURGERS and MIGHORST 1957) and of an extract of the dorsal skin secretion of *Xenopus laevis* (BURGERS & VAN OORDT 1956). In view of these similar dispersion patterns in the group mentioned, BURGERS was of the opinion that the hitherto unknown substances, present in urine of pregnant women and in the skin secretion of *Xenopus laevis* might also belong to the chemical group of catechol derivatives.

The present paper deals with a purification procedure and the identification of the melanocyte-stimulating compound in the dorsal skin secretion of *Xenopus laevis*. A partial and preliminary report of these studies was submitted for publication elsewhere (VAN DE VEERDONK 1960).

Experimental procedure

Biological test

Extracts of skin secretion and its different chromatographic fractions were tested for melanocyte activity, using the webs of both hindlegs of a light-adapted specimen of *Xenopus laevis*, as described by BURGERS

(1956). These webs were immersed in a physiological saline solution of the different fractions, and the melanocytes were studied after 30, 60 and 90 minutes, using a binocular microscope with a magnification of

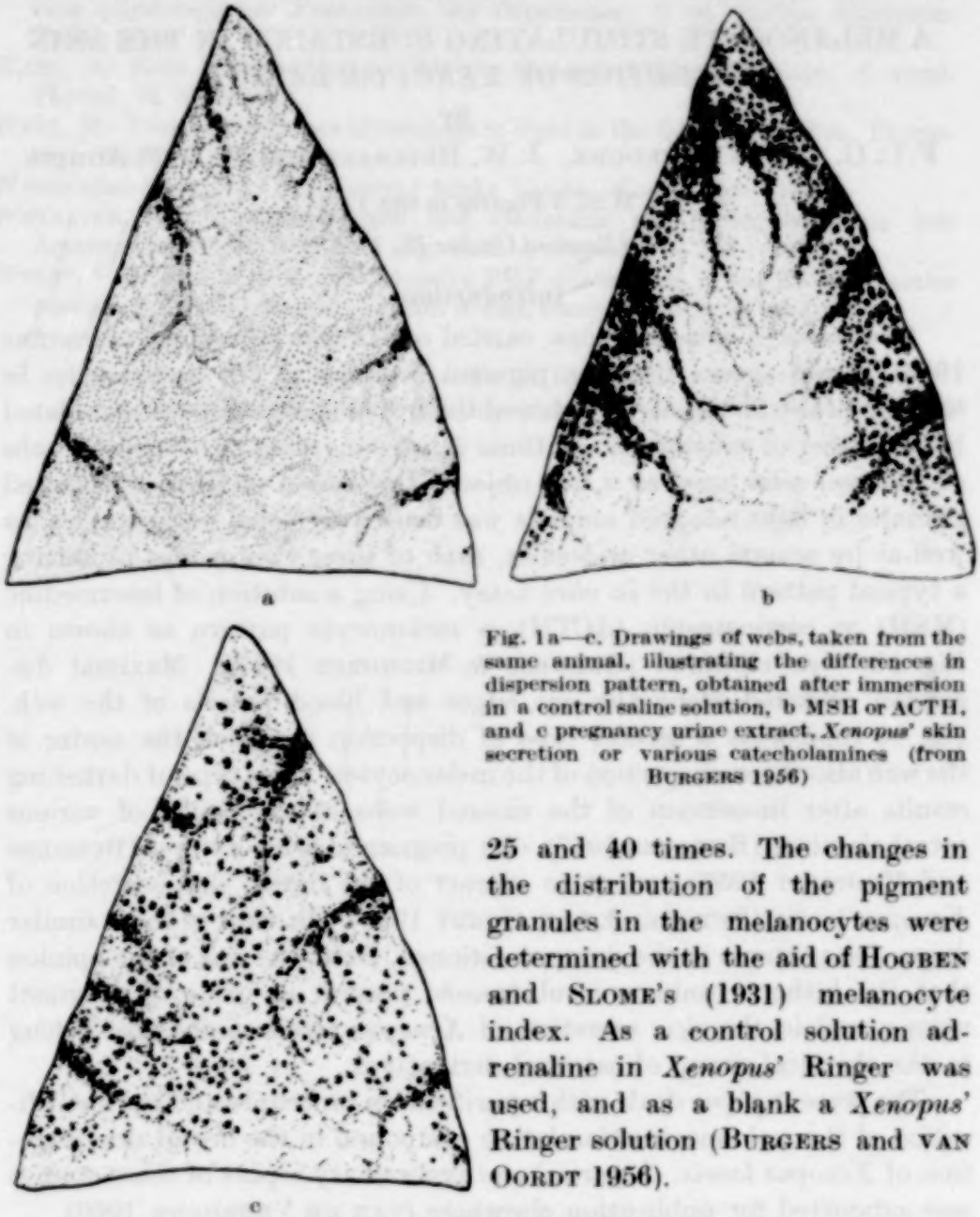

Fig. 1a—c. Drawings of webs, taken from the same animal, illustrating the differences in dispersion pattern, obtained after immersion in a control saline solution, b MSH or ACTH, and c pregnancy urine extract, *Xenopus*' skin secretion or various catecholamines (from Burgers 1956)

25 and 40 times. The changes in the distribution of the pigment granules in the melanocytes were determined with the aid of Hogben and Slome's (1931) melanocyte index. As a control solution adrenaline in *Xenopus*' Ringer was used, and as a blank a *Xenopus*' Ringer solution (Burgers and van Oordt 1956).

Preparation of the extract

Skin secretion was collected by massaging the dorsal skin glands of *Xenopus* with a microscope glass slide. The secretion sticked well to the surface of the slide, and could be scratched off after drying in a vacuum desiccator. The secretion collected in this way amounted 40 to 60 mg dry powder per animal (average body weight 25 g). A quantity of

200 to 300 mg of this material was used for identification procedures. The powder was defatted in a Potter Elvehjem grinding tube with chloroform or ether and subsequently extracted with methanol. The methanol extract was concentrated under reduced pressure in an atmosphere of nitrogen, below 40° C. This concentrate reacted strongly positive with several indole reagents, of which p-dimethylaminocinnamic aldehyde/hydrochloric acid (HARLEY-MASON & ARCHER 1958) was used as a routine spray.

Separation of the active indole component

The concentrated methanol extract was separated chromatographically into three indole containing groups. To achieve this separation, the concentrated extract was placed on the top of a column, containing 30g of alcali-free alumina („Woelm"). Elution was performed with pure methanol, followed by a 50% aqueous methanol solution; a gradient elution technique was also used. The eluates were separated in a fraction collector. With pure methanol the first indole containing group was eluated, which was inactive in the *in vitro* bioassay. In several chromatographic systems it proved to be homogenous but its chemical constitution has not yet been investigated. Elution with 50% aqueous methanol resulted in two indole containing groups, the first of which was only very small. Paper chromatographic studies revealed that it was not homogenous: it showed as much as three different spots with the dimethylaminocinnamaldehyde reagent. Its chemical and biological properties have not yet been investigated. The second indole containing group, eluated with the 50% aqueous methanol solution, proved to be homogenous in paper chromatography and in addition showed a marked dispersion of the pigment granules in the *in vitro* bioassay.

Identification of the active compound

The ultraviolet absorption spectrum of the active indole fraction possessed a maximum at 275 mμ with a shoulder at 295 mμ (Fig. 2), suggesting the presence of a hydroxy-group at position 5 (STOLL *et al.* 1955). The absorption spectrum showed a reversible acid-base shift, indicating that the hydroxy-group was not substituted. The existence of this free hydroxy-group was confirmed by paper electrophoresis at pH 13, during which the indole component moved towards the anode. Migration to the cathode in paper electrophoresis at pH 7 revealed the presence of an amino-group in the molecule, the presence of which was confirmed by adsorption of the indole compound on the weak cation-exchange resin, Amberlite HCG-50 (H^+). The active compound also produced a bright yellow fluorescence on paper, after spraying with

potassium dichromate/formol and drying at 100° C. (SHEPHERD *et al.* 1953). This suggested the indole compound being 5-hydroxytryptamine (serotonin) or its derivatives. Paper-chromatographic studies in a number of systems showed identical R_F-values for the active indole compound and synthetic serotonin (Table 1). Furthermore, synthetic serotonin and the active indole fraction were found identical with respect to: ultraviolet absorption spectrum, acid-base shift, elution curve from an alumina and Amberlite HCG-50 column, paper electrophoresis at pH 7 and 13, spray reactions of HARLEY-MASON & ARCHER (1958) and of SHEPHERD *et al.* (1953). Finally, synthetic serotonin caused the same type of dispersion in the *in vitro* test. Thus it may be concluded that the melanocyte-stimulating substance in *Xenopus*' skin secretion is identical with serotonin.

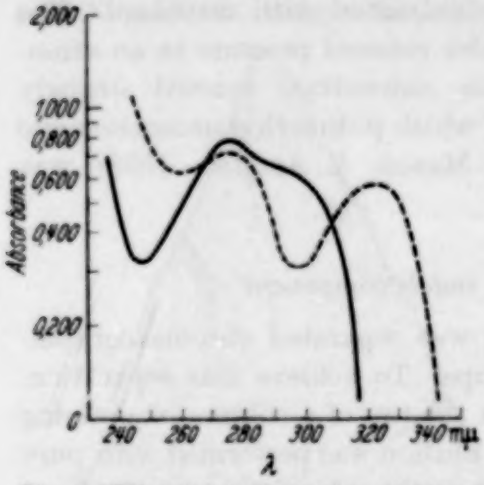

Fig. 2. Ultraviolet absorption spectrum of the biologically active compound, measured in 0,1 N HCl (solid line) and in 0,1 N KOH (broken line)

Table 1. *R_F-values of the active indole compound compared with synthetic serotonin*

Developing liquid	Active indole compound	Synthetic serotonin
20% aqueous KCl	0,34	0,34
propanol-1/water (3:1)	0,69	0,69
propanol-1/concd. ammonia/water (80:18:2)	0,60	0,60
butanol-1/satd. with 1 N HCl .	0,20	0,20
butanol-1/concd. HCl (98:2) after impregnating in 0,5 M KCl	0,41	0,43
butanol-1/acetic acid/water (4:1:5)	0,49	0,49
isobutanol-1/satd. with water .	0,19	0,22
phenol/0,1 N HCl (85:15) . .	0,49	0,48

The results, obtained from the above mentioned experiments were confirmed by isolation of serotonin in the form of its picrate from a quantity of 4,5 g of dried secretion. The red needles, thus obtained, were identified by determination of melting point and C, H, and N analysis. In determining the melting point the following changes were observed: at 160° the crystals lost colour, at 183° they turned brown and at 190—191° decomposition took place. These values agree well with those described in literature[1]. The C, H, and N

[1] The Merck Index 1960, p. 932.

analysis[1] resulted in 45,65% C, 4,16% H and 16,77% N. The calculated values for serotonin-picrate-H_2O were 45,40% C, 4,05% H and 16,55% N.

Quantitative estimation of the serotonin content

To estimate the quantity of serotonin in skin secretion, a spectrophotometric assay procedure was applied. The extinction at 275 mμ of synthetic 5-hydroxytryptamine creatininesulphate (S.C.S.) proved to be linear to the concentration over a sufficient wide range. In using the graph of Fig. 3 for the estimation of the serotonin content in the extracts of skin secretion, it had to be ascertained that

a) the creatininesulphate moiety did not contribute to the absorbance at 275 mμ, and

b) no losses occurred in passing serotonin over an alumina column.

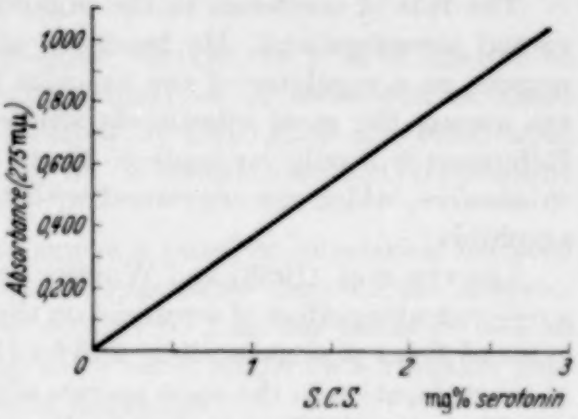

Fig. 3. Absorbance at 275 mμ of solutions of S.C.S. at different concentrations

To check these two points, a quantity of S.C.S. was adsorbed on alumina. Elution with 85% aqueous methanol resulted in creatinine-sulphate containing fractions and subsequent elution with 50% aqueous methanol gave pure serotonin containing fractions. The quantity of serotonin, thus eluted, corresponded exactly with the curve of Fig. 3, thus indicating the absence of any losses on the column and proving that the creatininesulphate moiety did not contribute to the absorbance of S.C.S. at 275 mμ.

Applying this method to the serotonin containing fractions of skin secretion, a serotonin content of 0,80 $\pm$ 0,20% (percentage of the dried secretion), was found as a result of seven experiments.

Discussion

As early as 1930, the skin secretion of *Xenopus laevis* was investigated by GUNN, who described the presence of an adrenaline-like compound, which, however, was not identical with adrenaline. His results, as well as those of SIEGLITZ (1951), who found an adrenaline-like substance in the skin of *Rana temporaria*, are in agreement with the properties of serotonin. Our conclusion that the skin secretion of *Xenopus* contained

[1] The determination of C, H and N, carried out by Mr. HUBERS of the Microanalytical Department of the Laboratory of Organic Chemistry, University of Amsterdam, is gratefully acknowledged.

serotonin, was further supported by the results of Udenfriend *et al.* (1952), who described the presence of this substance in the venom of *Bufo marinus*. He pointed to the fact that serotonin may serve as a precursor for its methylated derivatives *e.g.* bufotenine and bufotenidine. Erspamer & Vialli (1951) isolated serotonin from frog's skin and the substance described by Böhmer & Giersberg (1956) might be the same compound. The assumption of van Oordt & Burgers (1958) — based on a comparative study of the melanocyte patterns — that the active principle, present in *Xenopus*' skin secretion, should possess the 3,4-dihydroxybenzene configuration, proved to be incorrect.

The role of serotonin in the organism is currently subject of widespread investigations. Its functions as a contractile agent on smooth muscle, as a regulator of the vascular tone and its role in brain tissue are among the most intensively studied properties of this substance. Reference will only be made to those papers on serotonin and related substances, which are concerned with the colour changing capacities in amphibia.

Lerner *et al.* (1958) and Wright and Lerner (1960) have described a concentrating effect of serotonin on the pigment granules in the melanocytes of *Rana pipiens in vitro*. Davey (1959) reported a darkening effect of short duration in the same species after application *in vivo*, and Kahr and Fischer (1957) described a dispersing effect in *Rana temporaria* after application of serotonin *in vivo*. Furthermore, Burgers (unpublished) found a weak dispersing action in *Xenopus laevis in vivo*, corresponding with the results of our *in vitro* experiments. In view of these partly contradictory results, it is, at the present moment, still impossible to explain the mode of action of serotonin in changing the colour of amphibia. It seems likely that, apart from the pituitary-regulated darkening reactions, serotonin plays a dominant role in the excitement darkening reaction, described by Burgers (1956). With respect to the above mentioned contradictory results, it is of interest to mention the dual action of nicotine and caffeine (Stoppani 1942) and of adrenaline (Burgers *et al.* 1953), by which the pigment granules are dispersed in light-adapted animals and concentrated in dark-adapted ones. On the other hand, the melanocytes of *Xenopus laevis* seem to react in a contrary way, compared with most other amphibia (Burgers & van Oordt 1956).

A similar discrepancy of results exists in the melanocyte-stimulating properties of lysergic acid diethylamide (LSD), which also possesses the tryptamine configuration in the molecule. A dispersing action of LSD on the melanocytes of *Rana temporaria in vivo* has been described by Kahr and Fischer (1957). Burgers *et al.* (1958) found a concentrating effect *in vivo* and total absence of dispersion in their *in vitro*

experiments with *Xenopus*. The mode of action of LSD in other fields has been explained as a suppression of the central actions of serotonin (GADDUM 1953; WOOLLEY & SHAW 1954 and SHORE *et al.* 1955). BURGERS *et al.* (1958) confirm a central action of LSD in *Xenopus*. Their statement, however, that LSD acts *in vivo* by inhibition of the production and (or) the secretion of intermedine, may be correct, but is not supported by sufficient experimental data.

Reserpine and other Rauwolfia alkaloids also possess the tryptamine configuration in the molecule. Stimulatory effects by reserpine on the pigment migration of fishes have been described by TURNER (1958), but any activity in frogs was absent.

In connection with these tryptamine derivatives, it is of interest to mention the pigment concentrating capacities of melatonin in *Rana pipiens*. Melatonin, which was isolated by LERNER *et al.* (1958) from bovine pineal glands, proved to be N-acetyl-5-methoxytryptamine (LERNER *et al.* 1959).

The above mentioned results suggest a possible correlation between melanocyte-stimulating activity and tryptamine derivatives. A systematic study of these compounds, applied to *Xenopus laevis* as well as to other amphibia, *in vivo* as well as *in vitro*, might be a valuable contribution to the problem of pigment migration.

Summary

The melanocyte-stimulating substance, found in the dorsal skin secretion of *Xenopus laevis*, has been identified as 5-hydroxytryptamine (serotonin).

Acknowledgements. We are very grateful to Prof. G. J. VAN OORDT for his encouragement and support. The capable assistance of Miss A. W. VAN WIJNGAARDEN is gratefully acknowledged.

References

BÖHMER, U., und H. GIERSBERG: Untersuchungen über Histamin und eine pharmakologisch histaminähnlich wirkende Substanz und ihr Verhalten nach Bestrahlung mit UV. Naturwissenschaften **43**, 303 (1956).

BURGERS, A. C. J.: Investigations into the action of certain hormones and other substances on the melanophores of the South African clawed toad, *Xenopus laevis*. Thesis, Utrecht, 1956.

— The reactions of the melanophores of the South African clawed toad, *Xenopus laevis*, to phenylalkylamines and some other substances. Acta physiol. pharmacol. neerl. **5**, 263 (1957).

— T. A. C. BOSCHMAN and J. C. VAN DE KAMER: Excitement darkening and the effect of adrenaline on the melanophores of *Xenopus laevis*. Acta endocr. (Kbh.) **14**, 72 (1953).

— W. LEEMREIS, T. DOMINICZAK and G. J. VAN OORDT: Inhibition of the secretion of intermedine by D-lysergic acid diethylamide (LSD 25) in the toad, *Xenopus laevis*. Acta endocr. (Kbh.) **29**, 191 (1958).

Burgers, A. C. J., and J. C. A. Mighorst: Is the melanophore-dispersing substance in human pregnancy urine a 3,4-dihydroxybenzene derivative? Acta endocr. (Kbh.) **25**, 249 (1957).

—, and G. J. van Oordt: The effect of the skin secretion of *Xenopus laevis* on its dermal melanophores. Acta endocr. (Kbh). **23**, 265 (1956).

Davey, K. G.: Serotonin and change of colour in frogs. Nature (Lond.) **183**, 1271 (1959).

Erspamer, V., and M. Vialli: Presence of enteramine in the skin of amphibia. Nature (Lond.) **167**, 1033 (1951).

Gaddum, J. H.: Ciba Foundation Symposium, London, 1953.

Gunn, J. W. C.: The action of the skin secretion of the South African clawed toad. Quart. J. exp. Physiol. **20**, 1 (1930).

Harley-Mason, J., and A. A. P. G. Archer: Use of p-dimethylaminocinnamaldehyde as a spray reagent for indole derivatives on paper chromatograms. Biochem. J. **69**, 60P (1958).

Hogben, L. T., and D. Slome: The pigmentary effector system. VI. The dual character of endocrine co-ordination in amphibian colour change. Proc. roy. Soc. B **108**, 10 (1931).

Kahr, H., and W. Fischer: Die Wirkung des 5-Oxytryptamins auf das Pigmentsystem der Haut. Klin. Wschr. **35**, 41 (1957).

Lerner, A. B., J. D. Case, Y. Takahashi, T. H. Lee and W. Mori: Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J. Amer. chem. Soc. **80**, 2587 (1958).

— — and R. V. Heinzelman: Structure of melatonin. J. Amer. chem. Soc. **81**, 6084 (1959).

Oordt, G. J. van, and A. C. J. Burgers: Studies on pigment migrations in the melanophores of *Xenopus laevis*. Arch. néerl. Zool. **13**, 290 (1958).

Shepherd, D. M., G. B. West and V. Erspamer: Detection of 5-hydroxytryptamine by paper chromatography. Nature (Lond.) **172**, 357 (1953).

Shore, P. A., S. L. Silver and B. B. Brodie: Interaction of reserpine, serotonin, and lysergic acid diethylamide in brain. Science **122**, 284 (1955).

— Interaction of serotonin and lysergic acid diethylamide (LSD) in the central nervous system. Experientia (Basel) **11**, 272 (1955).

Sieglitz, G.: Über hormonale und nervöse Regulation des Farbwechsels beim Frosch *(Rana temporaria)*. Z. vergl. Physiol. **33**, 99 (1951).

Stoll, A., F. Troxler, J. Peyer and A. Hofmann: Eine neue Synthese von Bufotenin und verwandten Oxy-tryptaminen. Helv. chim. Acta **38**, 1452 (1955).

Stoppani, A. O. M.: Pharmacology of colour regulation in amphibia and the importance of endocrine glands. J. Pharmacol. exp. Ther. **76**, 118 (1942).

Turner, W. J.: Effect of *Rauwolfia* alkaloids and related substances on chromatophores. Dis. nerv. Syst. **19**, No 2 (1958).

Udenfriend, S., C. T. Clark and E. Titus: The presence of 5-hydroxytryptamine in the venom of *Bufo marinus*. Experientia (Basel) **8**, 379 (1952).

Veerdonk, F. C. G. van de: Serotonin, a melanocyte-stimulating component in the dorsal skin secretion of *Xenopus laevis*. Nature (Lond.) **187**, 948 (1960).

Woolley, D. W., and E. Shaw: A biochemical and pharmacological suggestion about certain mental disorders. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **40**, 228 (1954).

Wright, M. R., and A. B. Lerner: Action of thyroxine analogues on frog melanocytes. Nature (Lond.) **185**, 169 (1960).

Dr. F. C. G. van de Veerdonk, Zoölogisch Laboratorium der Rijks-Universiteit, Utrecht (Holland) Janskerkhof 3

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.

2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern einzuliefern. Diktierte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zur Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn sie neue Gedankengänge bezeichnen.

2. Die Arbeiten müssen *kurz* und ohne inhaltliche Wiederholung geschrieben sein. Arbeiten in den anderen Kongreßsprachen können nur aufgenommen werden, wenn es sich um die Muttersprache des Autors handelt. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) herzustellen.

3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenstellung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen.

5. Von jeder Versuchsart bzw. von jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber zu umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote darauf hinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.

6. Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken. Entscheidend für die Frage, ob Bild oder Text, ist im Zweifelsfall die Platzersparnis. Knappe, klare Figurenunterschriften erübrigen nochmalige Beschreibung im Text; sie sind auf einem gesonderten Blatt dem Manuskript beizufügen. Für jede Versuchsart, jedes Präparat ist nur *ein* gleichartiges Bild, Kurve u. ä. zulässig. Unzulässig ist im allgemeinen die *doppelte* Darstellung in Tabelle und Kurve. *Farbige* Bilder können nur in Ausnahmefällen Aufnahme finden. Didaktische Gesichtspunkte bleiben hierbei außer Betracht, da die Aufsätze in den Archiven nicht von Anfängern gelesen werden.

Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben und/oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden, transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweispfeile oder -linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.

7. Literaturangaben, die nur im Text berücksichtigte Arbeiten enthalten dürfen, erfolgen mit vollständigem Titel der Arbeit, Zeitschriftentitel (in der Abkürzung nach den World Medical Periodicals), Band-, Seiten- und Jahreszahl. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen *alphabetisch* anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammer gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

8. Die Beschreibung von Methodik, Protokollen und anderen weniger wichtigen Teilen ist für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.

9. Das Zerlegen einer Arbeit in mehrere Mitteilungen, um sie kürzer erscheinen zu lassen, ist unzulässig.

10. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.

11. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig hingegen sind einzeilige Fußnoten, mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt, und geleitet hat oder wem die Mittel verdankt werden. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

Burgers, A. C. J., and J. C. A. Mighorst: Is the melanophore-dispersing substance in human pregnancy urine a 3,4-dihydroxybenzene derivative? Acta endocr. (Kbh.) **25**, 249 (1957).

—, and G. J. van Oordt: The effect of the skin secretion of *Xenopus laevis* on its dermal melanophores. Acta endocr. (Kbh). **23**, 265 (1956).

Davey, K. G.: Serotonin and change of colour in frogs. Nature (Lond.) **183**, 1271 (1959).

Erspamer, V., and M. Vialli: Presence of enteramine in the skin of amphibia. Nature (Lond.) **167**, 1033 (1951).

Gaddum, J. H.: Ciba Foundation Symposium, London, 1953.

Gunn, J. W. C.: The action of the skin secretion of the South African clawed toad. Quart. J. exp. Physiol. **20**, 1 (1930).

Harley-Mason, J., and A. A. P. G. Archer: Use of p-dimethylaminocinnamaldehyde as a spray reagent for indole derivatives on paper chromatograms. Biochem. J. **69**, 60P (1958).

Hogben, L. T., and D. Slome: The pigmentary effector system. VI. The dual character of endocrine co-ordination in amphibian colour change. Proc. roy. Soc. B **108**, 10 (1931).

Kahr, H., and W. Fischer: Die Wirkung des 5-Oxytryptamins auf das Pigmentsystem der Haut. Klin. Wschr. **35**, 41 (1957).

Lerner, A. B., J. D. Case, Y. Takahashi, T. H. Lee and W. Mori: Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J. Amer. chem. Soc. **80**, 2587 (1958).

— — and R. V. Heinzelman: Structure of melatonin. J. Amer. chem. Soc. **81**, 6084 (1959).

Oordt, G. J. van, and A. C. J. Burgers: Studies on pigment migrations in the melanophores of *Xenopus laevis*. Arch. néerl. Zool. **13**, 290 (1958).

Shepherd, D. M., G. B. West and V. Erspamer: Detection of 5-hydroxytryptamine by paper chromatography. Nature (Lond.) **172**, 357 (1953).

Shore, P. A., S. L. Silver and B. B. Brodie: Interaction of reserpine, serotonin, and lysergic acid diethylamide in brain. Science **122**, 284 (1955).

— Interaction of serotonin and lysergic acid diethylamide (LSD) in the central nervous system. Experientia (Basel) **11**, 272 (1955).

Sieglitz, G.: Über hormonale und nervöse Regulation des Farbwechsels beim Frosch *(Rana temporaria)*. Z. vergl. Physiol. **33**, 99 (1951).

Stoll, A., F. Troxler, J. Peyer and A. Hofmann: Eine neue Synthese von Bufotenin und verwandten Oxy-tryptaminen. Helv. chim. Acta **38**, 1452 (1955).

Stoppani, A. O. M.: Pharmacology of colour regulation in amphibia and the importance of endocrine glands. J. Pharmacol. exp. Ther. **76**, 118 (1942).

Turner, W. J.: Effect of *Rauwolfia* alkaloids and related substances on chromatophores. Dis. nerv. Syst. **19**, No 2 (1958).

Udenfriend, S., C. T. Clark and E. Titus: The presence of 5-hydroxytryptamine in the venom of *Bufo marinus*. Experientia (Basel) **8**, 379 (1952).

Veerdonk, F. C. G. van de: Serotonin, a melanocyte-stimulating component in the dorsal skin secretion of *Xenopus laevis*. Nature (Lond.) **187**, 948 (1960).

Woolley, D. W., and E. Shaw: A biochemical and pharmacological suggestion about certain mental disorders. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **40**, 228 (1954).

Wright, M. R., and A. B. Lerner: Action of thyroxine analogues on frog melanocytes. Nature (Lond.) **185**, 169 (1960).

Dr. F. C. G. van de Veerdonk, Zoölogisch Laboratorium der Rijks-Universiteit, Utrecht (Holland) Janskerkhof 3

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.

2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern einzuliefern. Diktierte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zur Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn sie neue Gedankengänge bezeichnen.

2. Die Arbeiten müssen *kurz* und ohne inhaltliche Wiederholung geschrieben sein. Arbeiten in den anderen Kongreßsprachen können nur aufgenommen werden, wenn es sich um die Muttersprache des Autors handelt. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) herzustellen.

3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenstellung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen.

5. Von jeder Versuchsart bzw. von jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber zu umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote darauf hinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.

6. Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken. Entscheidend für die Frage, ob Bild oder Text, ist im Zweifelsfall die Platzersparnis. Knappe, klare Figurenunterschriften erübrigen nochmalige Beschreibung im Text; sie sind auf einem gesonderten Blatt dem Manuskript beizufügen. Für jede Versuchsart, jedes Präparat ist nur *ein* gleichartiges Bild, Kurve u. ä. zulässig. Unzulässig ist im allgemeinen die *doppelte* Darstellung in Tabelle und Kurve. *Farbige* Bilder können nur in Ausnahmefällen Aufnahme finden. Didaktische Gesichtspunkte bleiben hierbei außer Betracht, da die Aufsätze in den Archiven nicht von Anfängern gelesen werden.

Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben und/oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden, transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweispfeile oder -linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.

7. Literaturangaben, die nur im Text berücksichtigte Arbeiten enthalten dürfen, erfolgen mit vollständigem Titel der Arbeit, Zeitschriftentitel (in der Abkürzung nach den World Medical Periodicals), Band-, Seiten- und Jahreszahl. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen *alphabetisch* anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammer gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

8. Die Beschreibung von Methodik, Protokollen und anderen weniger wichtigen Teilen ist für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.

9. Das Zerlegen einer Arbeit in mehrere Mitteilungen, um sie kürzer erscheinen zu lassen, ist unzulässig.

10. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.

11. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig hingegen sind einzeilige Fußnoten, mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt, und geleitet hat oder wem die Mittel verdankt werden. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

Vor kurzem erschien:

Essentielle Hypertonie

Ein internationales Symposion

Veranstaltet mit Unterstützung der CIBA in Bern, 7.—10. Juni 1960

Leitung: Professor Dr. FRANÇOIS REUBI, Bern

Herausgegeben von Dr. KLAUS DIETRICH BOCK, Basel,
und Priv.-Dozent Dr. PAUL COTTIER, Bern

Mit 81 Abbildungen. VIII, 421 Seiten 8°. 1960. Ganzleinen DM 33,80

Das Buch erscheint gleichzeitig in einer deutschen und einer englischen Ausgabe

ZUR INFORMATION

Anläßlich eines vom 7.—10. Juni 1960 in Bern abgehaltenen Symposions haben 37 hervorragende Sachkenner aus Europa, Nord- und Südamerika in einer Reihe von Referaten und in ausführlicher Diskussion den gegenwärtigen Stand der Forschung auf diesem so vielschichtigen Gebiet umrissen und die zahlreichen noch offenen Probleme aufgezeigt. Wesen, Verlauf und Prognose der unbehandelten essentiellen Hypertonie wurden ebenso behandelt wie aktuelle Probleme des Mineralstoffwechsels, der Endokrinologie, der Pathophysiologie und der experimentellen Hochdruckforschung. Nach Vorträgen über die Pharmakologie, die Wirkungsmechanismen und den therapeutischen Effekt neuerer hypotensiv wirkender Stoffe aus experimenteller und klinischer Sicht war es jetzt, ein Dezennium nach Einführung wirksamer drucksenkender Medikamente, auch möglich, einen Überblick über den Einfluß dieser Therapie auf die Prognose der essentiellen Hypertonie zu geben. Besonders bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die Mitteilung, daß auch schwerste Hypertoniefälle nach genügend lange fortgesetzter intensiver Behandlung „geheilt" werden, d.h. ohne weitere Medikation normoton bleiben können.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz A G., Würzburg
Printed in Germany